

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LES PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA TRYPSINE ET LE POUVOIR ANTITRYPTIQUE DU SÉRUM DES COBAYES NEUFS ET IMMUNISÉS PAR PIERRE ACHALME.

L'étude des propriétés antidiastatiques des sérums est de date toute récente. Latente dans les travaux de Fermi, Hahn, Hildebrandt, elle ne s'est bien précisée que depuis les recherches de Morgenroth, sur la présure et les propriétés antiprésurantes du sérum. Mais, d'une part, l'absence d'action pathogène de la présure, d'autre part, l'obscurité qui règne sur la nature intime des phénomènes de coagulation qu'elle provoque, ne permettaient aucune comparaison entre le pouvoir antidiastatique et le pouvoir antitoxique.

Il m'a semblé que l'étude de l'action du sérum sur des diastases à action chimique bien définie pourrait être d'un certain secours dans l'explication de ces phénomènes si complexes, et que, si l'on pouvait trouver une diastase provoquant en même temps des effets pathogènes bien caractérisés, il serait possible d'établir une relation entre l'étude trop exclusivement chimique des diastases et celle trop exclusivement physiologique des toxines.

L'influence nuisible de la réaction alcaline du sérum sur l'action de l'émulsine et de la sucrase m'ont fait abandonner ces deux diastases après quelques recherches. L'urée ne m'a pas non plus donné les résultats que j'en espérais.

J'ai trouvé au contraire dans la pancréatine un excellent

instrument d'études, son action chimique étant facilement mesurable et la lésion qu'elle provoque en injections sous-cutanées étant très caractéristique et très constante.

Je m'étonne que cette dernière n'ait pas été plus attentivement décrite par les observateurs. Dans la littérature, on ne trouve qu'une courte mention de ce processus nécrotique dans le livre de M. Gautier sur les toxines microbiennes et animales. D'autres auteurs, par exemple Schepilewsky, insistent au contraire sur les suppurations consécutives aux injections de pancréatine. L'usage de liqueurs diastasiques insuffisamment privées de bactéries explique ces contradictions. Il est donc nécessaire de se mettre à l'abri de cette cause d'erreurs.

Préparation de la solution de pancréatine.

La pancréatine du commerce n'est autre chose que du pancréas de porc, traité par l'alcool et l'éther, puis réduit en poudre et tamisé. C'est de cette pancréatine que je me suis servi, et afin d'avoir des résultats certainement comparables, toutes mes expériences ont été faites avec de la pancréatine provenant d'un même achat.

Cette pancréatine se dissout mal dans l'eau et ne lui communique que lentement, par macération, des propriétés diastatiques. Un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, en présence d'un peu de chloroforme pour empêcher la fermentation, est le meilleur moyen d'obtenir une solution présentant une grande activité.

La proportion de 5 0/0 de pancréatine sèche m'a paru la plus commode pour l'expérimentation. Au-dessous de cette dose, l'activité de la solution est insuffisante, et on est obligé d'injecter de trop grandes quantités de liquide pour provoquer les lésions décrites plus loin.

Après 24 heures de séjour à l'étuve, la macération est filtrée sur papier, puis exactement neutralisée, s'il y a lieu, de manière à être insensible à la phtaléine du phénol et au méthyl-orange. Mais, ainsi préparée, elle n'est pas suffisamment débarrassée de bactéries, et, injectée telle quelle, elle donne lieu à des septicémies et à des abcès qui ont forcément obscurci l'histoire des accidents consécutifs aux injections de cette diastase. Il est en

effet remarquable que la pancréatine est un très puissant favorisant de l'infection microbienne, et qu'un microbe de race peu pathogène (*Bacterium coli*, *Proteus*) donne lieu à des accidents mortels s'il est injecté en même temps qu'une solution tryptique.

Le seul moyen de se mettre avec certitude à l'abri de ces accidents d'infection est la filtration sur bougie de porcelaine. Contrairement à l'opinion généralement répandue, la pancréatine filtre très bien, surtout si l'on opère sur une solution tiède de 35° à 38°, et avec une bougie bien poreuse, neuve ou soigneusement régénérée. La déperdition diastasique résultant de la filtration est d'environ 25 à 35 0/0.

La pancréatine filtrée sur porcelaine présente toutes les propriétés diastasiques de la pancréatine ordinaire. Elle dissout l'albumine de l'œuf, la fibrine, digère le lait, liquéfie la gélatine, saccharifie l'amidon, acidifie les solutions de monobutyrine. Je signale néanmoins que je n'ai jamais, dans les digestions artificielles que j'ai faites, observé la formation de cristaux de tyrosine. Mais, ainsi que le fait observer M. Duclaux ces précipités sont très capricieux, même avec la pancréatine ordinaire, et il n'y a rien à conclure de leur absence.

Mesure de l'action tryptique de la pancréatine et du pouvoir antitryptique du sérum.

Pour mesurer l'action tryptique d'une pancréatine, et mieux encore l'action antitryptique d'un sérum, j'ai préféré à la fibrine colorométrique de Gehrig ou aux tubes de Mette une méthode plus simple, basée sur les changements d'aspect présentés par le lait sous l'influence de la digestion pancréatique.

Mes recherches sur les diastases du pus m'ont en effet, conformément à l'opinion de M. Duclaux, porté à admettre l'identité entre la caséase et la trypsine, alors que quelques doutes subsistent en ce qui concerne la diastase qui liquéfie la gélatine.

La précipitation de la caséine, puis la redissolution du précipité, aboutissant à la clarification complète de la liqueur, offrent à l'observateur des éléments qui permettent de bien suivre la marche du phénomène et d'arriver à des évaluations comparatives très précises.

Pour cela, le lait, soigneusement écrémé, est réparti dans de

petits tubes de diamètre égal : chacun en reçoit 3 c. c. Les tubes sont ensuite stérilisés une demi-heure à 120°.

Le sérum et la solution diastasique étant amicrobiens, les digestions peuvent se prolonger autant qu'il est désirable sans qu'il soit nécessaire d'introduire une substance étrangère pour protéger le milieu contre l'envahissement des microbes. Pourtant, afin d'éviter le développement des bactéries qui auraient pu contaminer le liquide pendant les manipulations, il est préférable d'opérer à une température élevée, 45° ou 46° par exemple, qui, tout en restant très favorable à l'action de la trypsine, l'est fort peu au développement microbien.

Pour mesurer l'action antitryptique d'un sérum, il suffit d'ajouter une goutte de sérum à un certain nombre de tubes de lait, et d'y introduire ensuite un nombre progressif de gouttes de solution tryptique. On observe alors les modifications qui se produisent, et, après un temps déterminé, 24 heures par exemple, on note le numéro du premier tube resté intact, qui donne ainsi le nombre de gouttes de solution diastasique neutralisées par une goutte de sérum. Si l'on opère à la fois sur plusieurs sérums, par exemple un sérum de cobaye neuf et un sérum de cobaye vacciné, on peut aussi évaluer d'une manière exacte l'augmentation du pouvoir antitryptique résultant de l'immunisation.

Si l'on veut donner à ces évaluations une valeur plus absolue, il est possible de préparer une solution tryptique présentant une activité à peu près constante. On peut en effet prendre comme solution normale une liqueur dont 5 gouttes, à 45°, digèrent les 3 c. c. de lait d'un tube en une heure. Ce choix n'est pas arbitraire. Le mode de préparation indiqué plus haut donne en effet une solution possédant en général un pouvoir légèrement supérieur : par l'addition d'un peu d'eau physiologique stérilisée, on peut facilement la ramener à la force de cette solution normale. En prenant un lait de même densité, et en le préparant toujours de la même manière, on peut aussi assurer aux conditions expérimentales une constance suffisante pour que les résultats soient comparables.

Lésion provoquée par la pancréatine chez le cobaye.

Lorsqu'on inocule dans le tissu cellulaire sous-cutané du cobaye 3 ou 4 c. c. de la solution de pancréatine à 5 0/0 filtrée

LA
PRATIQUE DERMATOLOGIQUE

TRAITÉ DE DERMATOLOGIE APPLIQUÉE

Publié sous la direction de MM.

ERNEST BESNIER | L. BROCC
L. JACQUET

PAR MM.

AUDRY, BALZER, BARBE, BAROZZI, BARTHÉLEMY,
BÉNARD, E. BESNIER, BODIN, BROCC, DE BRUN, BISSÉRIÉ, DU CASTEL, J. DARIER,
DÉHU, DOMINICI, W. DUBREUILH, HUDELO, L. JACQUET, J.-B. LAFFITTE,
LENGLET, LEREDDE, MERKLEN, PERRIN, RAYNAUD, RIST, SABOURAUD,
MARCEL SÉE, GEORGES THIBIERGE, VEYRIÈRES

4 volumes très grand in-8° richement reliés toile, formant ensemble environ
3.600 pages, très largement illustrés de figures en noir et de planches hors texte
en couleurs. En souscription jusqu'à la publication du tome III . . . 150 fr.

TOME I

1 volume gr. in-8° de 960 pages avec 230 figures en noir et 24 planches en couleurs,
hors texte, richement relié toile . . . 36 fr.

Principaux articles du tome I. — Anatomie et physiologie de la peau. — Pathologie générale de la peau. — Symptomatologie générale des dermatoses. — Acanthosis nigricans. — Acnés. — Actinomycose. — Adénomes. — Alopecies. — Anesthésie locale. — Balanites. — Bouton d'Orient. — Brûlures. — Charbon. — Classifications dermatologiques. — Dermatitis polymorphes douloureuses. — Dermatophytes. — Dermatozoaires. — Dermites infantiles simples. — Ecthyma.

TOME II

1 volume gr. in-8° de 1038 pages, avec 168 figures en noir et 21 planches en couleurs
hors texte, richement relié toile . . . 40 fr.

Principaux articles du tome II. — Eczéma. — Electricité. — Eléphantiasis. — Epithéliomes. — Eruptions artificielles. — Erythèmes. — Erythrasma. — Erythrodermes. — Esthiomène. — Favus. — Folliculites. — Furunculose. — Gale. — Gangrène cutanée. — Gerçures. — Greffes. — Hématodermes. — Herpès. — Hydroa vacciniforme. — Ichthyose. — Impétigo. — Kératodermie symétrique. — Kératose pilaire. — Langue.

TOME III

1 vol. gr. in-8°, avec nombreuses figures en noir et planches en couleurs hors texte.
Richement relié toile (Sous presse).

Principaux articles contenus dans le tome III. — Lèpre. — Lichen. — Lupus. — Lymphangiome. — Mycosis fongique. — Œdème. — Ongles. — Pelade. — Pemphigus. — Phtiriase. — Pityriasis.

MALADIES DU CUIR CHEVELU

I. — LES MALADIES SÉBORRHÉIQUES

SÉBORRHÉE, ACNÉS CALVITIE

PAR

Le D^r R. SABOURAUD

Chef du laboratoire de la Ville de Paris à l'hôpital Saint-Louis.

1 vol in-8° avec 91 figures
dans le texte dont 40 aqua-
relles en couleurs. 10 fr.

Depuis que M. Sabouraud annonça pour la première fois que la *Séborrhée* et la *Calvitie séborrhéique* étaient des maladies microbiennes (*Annales de l'Institut Pasteur*, février 1897), le public scientifique attendait une monographie complète du sujet pour juger les progrès accomplis dans l'étude de ces maladies si communes et jusque-là si mal connues.

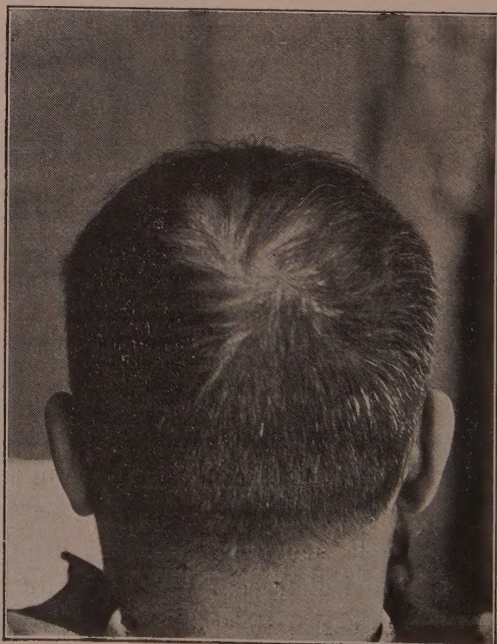


FIG. 80. — Calvitie vulgaire à son début. La tonsure.

C'est ce travail que M. Sabouraud nous donne aujourd'hui,

sur bougie de porcelaine, on observe les phénomènes suivants :

D'abord un gonflement rapide se produit autour du point d'inoculation, et est déjà très accentué au bout de dix minutes. Puis la peau devient humide par suite d'une abondante exsudation de sérosité. Au bout de 3 ou 4 heures, elle présente un aspect macéré, et les poils s'en détachent avec facilité sur une surface parfois fort étendue, la moitié de la région abdominale par exemple, si l'inoculation a été faite à la racine d'un des membres postérieurs. Le derme mis à nu présente une couleur cyanotique et toute la région est le siège d'un gonflement œdémateux. Peu à peu l'apparence ecchymotique fait place à une coloration plus foncée, le suintement séreux s'arrête, et la partie malade se dessèche superficiellement pour présenter au bout de 15 à 20 heures l'aspect d'une escarre parfaitement caractérisée. Si la dose a été trop forte ou l'animal insuffisamment résistant, la mort peut survenir au bout de 36 heures ; sinon, après 2 ou 3 jours, un sillon d'élimination apparaît, l'escarre se détache et sa chute est bientôt suivie d'un processus de cicatrisation qui évolue souvent avec une rapidité surprenante.

Si l'on sacrifie l'animal pendant les premières heures du processus, on constate que dans toute la région tuméfiée, le tissu sous-cutané est le siège d'un œdème gélatiniforme rosé, absolument analogue à celui que l'on trouve à l'autopsie des animaux inoculés avec le vibrion septique. Cet œdème peut envahir le tissu sous-cutané, même à une grande distance du point d'inoculation. Les muscles sous-jacents présentent un œdème interstitiel avec une congestion interne, allant en certains points jusqu'à la formation de petites ecchymoses. L'examen microscopique du liquide infiltré montre la présence d'un grand nombre de globules rouges et l'absence de microorganismes, absence facilement contrôlée par les cultures.

Si la mort est survenue spontanément, on ne constate aucune lésion viscérale, si ce n'est de la congestion pulmonaire et rénale. Le sang du cœur n'est pas coagulé ; enfin, si un peu de temps s'est écoulé entre le moment de la mort et celui de l'autopsie, on observe fréquemment une disparition presque complète de la paroi stomacale par auto-digestion. Ce phénomène remarquable est encore plus accusé et plus constant lorsque l'animal a été intoxiqué par la papaïne.

J'ai étudié histologiquement la lésion nécrotique aux différentes phases de sa production. Elle consiste d'abord en une véritable paralysie vasomotrice des capillaires sanguins, qui augmentent de volume et laissent passer en abondance le sérum et les globules rouges, sans que l'on puisse observer de changements bien nets dans la colorabilité des cellules du tissu conjonctif et des parois vasculaires. Les cellules épidermiques, macérées par l'exsudation séreuse, se détachent ensuite et tombent, laissant les papilles presque à nu. A cette seconde période, le tissu sous-cutané est uniformément infiltré de globules rouges peu altérés : autour des capillaires de la couche papillaire et de la couche profonde du derme apparaît une abondante diapédèse de leucocytes polynucléaires. Les cellules du tissu conjonctif des parties infiltrées conservent encore à cette période leur aspect habituel et leur colorabilité normale, qui ne se modifient que tardivement, alors que macroscopiquement l'escarre est nettement caractérisée.

D'après cet examen, il semble donc que les phénomènes vaso-moteurs jouent le principal rôle dans la production de la lésion, et que la nécrose résulte plutôt d'un véritable étranglement circulatoire que d'une mortification directe des tissus sous l'influence de la pancréatine.

La complexité de cette dernière, et la presque impossibilité de séparer les unes des autres les diverses diastases que l'on y rencontre, rendent difficiles toutes les recherches ayant pour but d'isoler la substance à l'activité de laquelle est dû le processus ci-dessus décrit. Néanmoins, en procédant par analogie, on peut se convaincre facilement que la trypsine est l'élément nocif. Alors que d'autres amylases ou d'autres lipases ne montrent en effet aucun pouvoir pathogène, on peut au contraire reproduire des accidents absolument identiques à l'aide d'une solution de papaïne filtrée sur bougie de porcelaine. Or les solutions de pancréatine et de papaïne n'ont pas d'autre caractère commun que l'analogie de leur action tryptique sur les substances albuminoïdes.

Si l'on considère d'autre part que la lésion produite présente également de grandes ressemblances avec celles que causent les microbes fortement trypsinogènes, comme le vibron septique, le bacille du charbon symptomatique, le bacille du rhumatisme,

il sera logique d'attribuer à la trypsine le rôle prépondérant dans la pathogénie de la lésion pancréatinique.

Vaccination du cobaye.

Dès le début de mes recherches, j'ai constaté que les injections intrapéritonéales de pancréatine étaient beaucoup mieux supportées que les injections hypodermiques. On peut en effet introduire dans le péritoine jusqu'à 10 c. c. de solution de pancréatine à 5 0/0 sans provoquer autre chose que des accidents passagers. Ces accidents consistent en une sorte de stupeur de l'animal, avec rigidité presque tétanique des parois abdominales ; cette stupeur est quelquefois suivie d'un peu de diarrhée sanguinolente.

Si l'on sacrifie l'animal après une injection intrapéritonéale, on constate une rougeur uniforme de la séreuse et de l'intestin, et la présence dans la cavité d'une assez grande quantité de sérosité rosée contenant des globules rouges en suspension. La pathogénie de la lésion est la même que dans le tissu cellulaire sous-cutané ; mais, par suite de l'épanchement de la sérosité dans la cavité péritonéale ou intestinale, la paralysie vaso-motrice n'aboutit pas ici à l'étranglement et à la nécrose.

L'utilisation de ce phénomène permet d'obtenir l'immunisation des cobayes d'une manière beaucoup plus sûre et plus rapide que par l'inoculation sous-cutanée. En injectant dans le péritoine d'un cobaye adulte 5 c. c. de solution de pancréatine, puis le lendemain et le surlendemain 10 c. c., on peut dès le 4^e jour introduire sous la peau du flanc 2 c. c. et continuer les injections tous les 2 jours en augmentant chaque fois de 2 c. c., de manière à atteindre, le 12^e jour, la dose de 10 c. c., c'est-à-dire plus de deux fois la dose mortelle pour un cobaye de force moyenne.

Pour ne pas s'exposer à des mécomptes dans la pratique des injections intrapéritonéales, il est nécessaire de faire la piqûre dans la région péri-ombilicale. Au-dessus, l'estomac distendu est souvent appliqué si intimement contre la paroi que l'aiguille pénètre facilement dans son intérieur, et que l'injection a lieu dans la cavité stomacale et non dans la cavité péritonéale. Si l'on fait au contraire l'injection trop bas, on risque de léser les vésicules séminales ou les cornes utérines et de provoquer des accidents mortels. Dans la région ombilicale au contraire, si

l'aiguille est introduite doucement après la perforation de la peau, l'intestin fuit devant elle et l'injection ne cause aucun accident.

Les injections sous-cutanées doivent être faites de préférence dans les régions où la peau est doublée d'un tissu cellulaire lâche, la peau du flanc par exemple. La réaction vaso-motrice est plus rapide encore chez les animaux vaccinés que chez les cobayes neufs. Le gonflement est moins étendu, mais assez intense pour donner lieu par la piqure de l'aiguille à un écoulement de sérosité rosée qui débute aussitôt après l'injection. La rougeur et la tuméfaction se dissipent en quelques heures sans laisser aucune induration au point d'inoculation.

Des coupes de la lésion cutanée des animaux vaccinés montrent un processus identique à celui décrit chez les animaux neufs : la diapédèse des leucocytes polynucléaires semble néanmoins plus précoce et plus abondante.

La vaccination éprouve beaucoup les animaux qui y sont soumis. Ils maigrissent au point de perdre jusqu'au quart de leur poids. Ils deviennent tristes, mangent peu. Leurs poils deviennent secs, ternes, et s'arrachent facilement.

Si l'inoculation sous-cutanée a été trop forte, l'escarre qui se produit se détache plus difficilement que chez le cobaye neuf. L'ulcération qui en résulte se cicatrise beaucoup plus lentement et devient plus fréquemment le point de départ d'une infection générale mortelle.

A l'autopsie des animaux sacrifiés ou morts spontanément, on trouve le foie, les reins et les capsules surrénales congestionnés. La rate est toujours volumineuse, tout en présentant un aspect lavé assez caractéristique.

Action antitryptique du sérum de cobaye neuf.

L'action antitryptique du sérum sanguin a été déjà sommairement signalée par plusieurs auteurs, tels que Camus et Gley, Hahn, Landsteiner, Georges Dean, Surmont, Carnot et enfin par Mesnil qui donnait, dans le numéro de mai 1901 des *Annales de l'Institut Pasteur*, une étude comparée des sérums normaux sur la diastase protéolytique qu'il a retirée des actinies.

Me servant, pour mesurer le pouvoir antitryptique, du lait que ce dernier auteur n'avait employé que pour mesurer le pouvoir antiprésurant, je me suis assuré que le sérum de cobaye neuf ou vacciné, recueilli aseptiquement et *séparé le plus rapidement possible du caillot*, ne provoque par lui-même aucune modification. Ajouté même en grande quantité (15 gouttes par 3 c. c. de lait), il ne produit après 48 heures de contact à 45° ni coagulation ni digestion.

Le sérum, même normal, ajouté en quantité insuffisante pour neutraliser l'action de la trypsine (1 goutte pour 10 gouttes de solution tryptique) produit une modification dans le processus de digestion. La pancréatine seule, en effet, ne coagule pas le lait; il se produit tout au plus un très fin précipité de caséine qui se redissout rapidement. En présence du sérum, il se fait au contraire une véritable coagulation en masse, qui dure peu et est suivie de la fragmentation du coagulum et de sa redissolution. A quoi est dû cet effet présurant?

Faut-il l'attribuer à la pancréatine qui, en présence du sérum, produirait une action coagulatrice plus marquée? Faut-il admettre que l'action de la trypsine met en liberté une présure contenue dans le sérum à l'état latent? Cette dernière explication me semble contredite par le fait que l'adjonction d'une plus grande quantité de sérum neutralise également l'action coagulante. En tout cas, lorsque la quantité de trypsine est grande par rapport à la quantité de sérum, cette coagulation exerce plutôt une action favorable sur le processus digestif. En effet, la digestion d'un tube de lait contenant 10 gouttes de trypsine et 1 goutte de sérum est plus rapidement complète que celle d'un tube ne contenant que les 10 gouttes de solution diastasique.

Si l'on diminue la quantité de diastase par rapport à celle du sérum, on observe le résultat inverse. La coagulation est encore rapide, mais la redissolution est retardée, et arrive même à ne pas se faire complètement, même au bout d'un temps très long.

Enfin, si la dose est suffisante, il ne se produit aucune modification dans le lait qui garde son apparence normale.

Voici les chiffres moyens obtenus avec la même solution diastasique (6 gouttes digèrent 3 c. c. de lait en 1 heure à 45°)

et plusieurs sérums de cobaye neuf. Les écarts entre le pouvoir antitryptique de ces divers sérums étaient du reste peu importants :

Pour une goutte de sérum, 10	gouttes de trypsine :	digestion plus rapide que celle du tube témoin.
—	6 gouttes de trypsine :	digestion en même temps que celle du tube témoin.
—	4 gouttes de trypsine :	coagulation rapide, mais redissolution ralentie.
—	2 gouttes de trypsine :	coagulation lente, redissolution incomplète, même après 48 heures.
—	1 goutte de trypsine :	aucune modification.

Les chiffres précédents expriment le rapport entre le nombre de gouttes de sérum et de solution tryptique ; mais pour ne pas prolonger indéfiniment la réaction, il est préférable, lorsqu'on emploie moins de 4 gouttes de trypsine, d'augmenter la quantité de sérum au lieu de diminuer celle de trypsine, la proportion restant la même.

Action antitryptique du sérum de cobaye vacciné.

Avec le sérum de cobaye vacciné, la marche des phénomènes est la même qu'avec le sérum normal ; mais la dose nécessaire est considérablement moindre. Alors que le sérum de cobaye neuf n'arrive à neutraliser qu'une fois son volume de solution tryptique, j'ai pu obtenir d'animaux vaccinés du sérum neutralisant *in vitro* jusqu'à huit fois son volume de solution tryptique.

Arrivé à ce pouvoir antitryptique, le sang présente d'intéressantes modifications, et l'on peut, par le seul examen du caillot, se rendre compte de la valeur antitryptique du sérum. Le caillot du sang normal contient en effet une substance analogue, sinon identique, à la trypsine. Cette substance en produit la redissolution plus ou moins complète après un temps en général assez long en ce qui concerne le cobaye, si le caillot est conservé aseptiquement dans un tube scellé. Le caillot devient noir, perd sa consistance, et laisse, s'il est suspendu, s'écouler un liquide fortement teinté par de l'hémoglobine plus ou moins altérée.

Le caillot du sang d'un animal fortement vacciné conserve au contraire, dans les mêmes conditions, sa couleur rutilante, et sa consistance pendant un temps indéterminé.

Il est probable que c'est à l'action antitryptique du sérum qu'est due cette action définitive contre les diastases, qui causent l'altération et la redissolution du caillot de sang normal.

En effet, si l'on met dans un petit tube 5 gouttes de sang défibriné de cobaye neuf, et dans un autre 5 gouttes de sang défibriné de cobaye vacciné, qu'on ajoute à chacun 2 c. c. d'eau physiologique et 10 gouttes de solution tryptique, on constate qu'au bout d'une heure, les globules du sang normal sont complètement dissous et l'hémoglobine décolorée en laissant un sédiment noirâtre. Les globules du sang de l'animal vacciné restent au contraire longtemps inaltérés et l'on n'observe pas, même après 24 heures, de changements dans la coloration de l'hémoglobine.

Action préservatrice du sérum de cobaye vacciné.

Le sérum qui exerce son pouvoir antitryptique *in vitro* peut, lorsqu'il est inoculé en même temps que la trypsine, préserver les animaux contre la nécrose. Si l'on ajoute en effet 15 gouttes de sérum de cobaye fortement vacciné à 4 c. c. de solution tryptique, et si l'on inocule ce mélange à un petit cobaye, alors qu'un témoin du même poids présente une escarre à laquelle il succombe rapidement, on observe les phénomènes suivants :

L'animal ne présente aucun phénomène local; la paralysie vaso-motrice, le gonflement font absolument défaut, et le liquide de l'injection est immédiatement résorbé. Mais après une ou deux minutes apparaissent des soubresauts, du tremblement, puis l'animal tombe dans un état de torpeur presque comateuse. Au bout d'une heure, ces phénomènes se dissipent et l'animal retrouve rapidement sa gaieté et son appétit, sans présenter jamais aucun phénomène local au point d'inoculation.

Le sérum agit donc surtout en neutralisant l'action vaso-motrice de la trypsine. Les accidents nerveux observés sont dus soit à la trypsine elle-même, soit à des impuretés de la solution, dont l'absence de réaction locale permet le brusque passage dans la circulation générale.

La faible quantité de sérum dont je disposais ne m'a pas permis d'arriver à des résultats absolument concluants en ce qui concerne l'action préventive ou curatrice du sérum. Je me

propose de combler cette lacune par la vaccination d'animaux plus volumineux que le cobaye.

Action des sérums sur la papaïne.

Toutes les recherches que j'ai faites avec la papaïne sont restées jusqu'ici négatives.

In vitro, l'addition même de quantités considérables de sérum d'animal, immunisé ou non, à la solution de papaïne filtrée sur porcelaine, ne modifie en rien le processus de digestion du lait, qui suit une marche parallèle dans les tubes additionnés de sérum et les témoins.

Les animaux, même fortement immunisés contre la pancréatine, présentent des escarres étendues et succombent à l'injection d'une quantité de papaïne égale à celle qui détermine des accidents semblables chez des témoins de même poids.

J'ai échoué dans toutes les tentatives de vaccination du cobaye contre la papaïne, par la méthode employée pour la pancréatine. Les cobayes supportent l'injection intrapéritonéale de quantités relativement considérables de solution de papaïne (40 c. c. de solution à 5 0/0); mais même après plusieurs injections intrapéritonéales, je n'ai pas observé de modifications dans le processus nécrotique local consécutif à l'injection sous-cutanée.

Action de la chaleur sur le sérum antitryptique.

La question des cytases et des sensibilisatrices donne à l'étude de l'action de la chaleur sur le sérum antitryptique une importance toute spéciale. Elle peut en effet, comme nous allons le voir, fournir des notions de premier ordre en ce qui concerne l'action de la chaleur sur ces corps.

Les conditions de température expérimentées ont été les suivantes : 1° Une heure de chauffage à 55°-56°; le sérum commence à présenter un trouble à peine sensible; 2° une heure de chauffage à 64°-65°; à cette température le sérum de cobaye présente un trouble très accusé, mais il est encore très nettement liquide; 3° une heure de chauffage à 66°-67°; la consistance du sérum devient gélatineuse; 4° une demi-heure à 100°; coagulation complète.

1° *Chauffage à 55°-56°.* — Le chauffage à cette température a

pour résultat un affaiblissement marqué du pouvoir antitryptique du sérum. Après une heure de chauffage, ce pouvoir est réduit d'environ 50 0/0. Cette réduction est proportionnellement égale pour le sérum de cobaye neuf et le sérum de cobaye vacciné.

2° *Chauffage à 64°-65°*. — Le chauffage à cette température fait disparaître complètement le pouvoir antitryptique du sérum ajouté au lait suivant la méthode précédente. On peut ajouter 10 gouttes de sérum pour une goutte de trypsine, sans que la puissance digestive de cette dernière soit le moins du monde modifiée ou même retardée. Pendant toute la durée de la réaction, les tubes contenant le sérum et les tubes témoins présentent le même aspect.

Néanmoins, si l'on ajoute le sérum chauffé, en apparence inactif, du cobaye vacciné, à du sérum d'animal neuf en quantité insuffisante pour neutraliser la trypsine, on constate que le pouvoir antitryptique du mélange est considérablement supérieur à celui du sérum de cobaye seul. Le sérum de cobaye vacciné chauffé a donc agi comme une sensibilisatrice.

Chauffage à 66°-67°. — Après chauffage à cette température, le sérum présente un aspect gélatiniforme et peut être ajouté dans la solution tryptique et même au sérum neuf sans provoquer aucune modification dans la marche de la digestion du lait. Néanmoins, si l'on ajoute à du sérum ainsi gélifié quelques gouttes de solution tryptique (10 gouttes pour 1 c. c.) et que l'on place le mélange au bain-marie à 45°, on observe les phénomènes suivants :

Le sérum de l'animal neuf se trouble presque aussitôt; au microscope, ce trouble apparaît comme formé d'un précipité granuleux et de quelques cristaux minces, carrés, solubles dans l'éther (cholestérine?). Après 12 heures de contact, le chauffage au bain-marie à 100° ne provoque aucune coagulation, et l'examen chimique du liquide montre qu'il s'est formé une quantité notable de peptone.

Dans les mêmes conditions, le sérum de l'animal immunisé ne présente aucun trouble. Après 24 heures de contact avec la trypsine, le chauffage au bain-marie à 100° provoque une coagulation en masse. La trypsine n'a donc exercé sur lui aucune action.

Il résulte de cette expérience qu'un sérum, inactif en appa-

rence lorsqu'on l'ajoute au lait, a néanmoins conservé son pouvoir antitryptique, et qu'il peut se défendre lui-même contre l'action de la trypsine. La substance active n'est donc pas détruite à la température de 67°; elle est simplement immobilisée et ne peut quitter, pour se porter sur une substance, le précipité albumineux dont elle fait partie intégrante. Cette notion, qui n'était jusqu'ici qu'une hypothèse, semble définitivement acquise par l'expérience précitée.

Chauffage à 100°. — Le chauffage au bain-marie (un quart d'heure dans l'eau bouillante) détruit complètement le pouvoir antitryptique du sérum. Le sérum d'un animal immunisé, coagulé à cette température, est digéré par la trypsine dans le même temps que le sérum d'un animal neuf.

Sérum antipancréatique.

L'importance physiologique du pancréas, la différenciation élevée de ses cellules devaient inviter à rechercher l'obtention de cytotoxines antipancréatiques. Il ne semble pas que ni M. Surmont ni M. Carnot soient encore arrivés dans ce sens à des résultats bien précis. Les recherches que j'ai faites, depuis le mois d'octobre 1900, m'ont conduit néanmoins à quelques notions intéressantes pouvant fournir l'explication de certains faits, en apparence contradictoires, observés par ces auteurs.

Je me suis servi de pancréas de chien, broyés aseptiquement et injectés dans le muscle pectoral de l'oie. Les premières injections sont bien supportées, mais les injections suivantes donnent lieu à des escarres pouvant être suivies d'infection mortelle.

Le sérum d'oie ayant reçu des injections de pancréas ne produit chez le chien, en inoculation sous-cutanée, que quelques accidents passagers consistant principalement en tristesse et perte d'appétit. Je n'ai pas fait d'injection intrapancréatique, car les propriétés souvent violemment phlogogènes du sérum d'oie normale me faisaient craindre que les accidents que j'aurais pu observer ne présentassent rien de spécifique.

L'examen *in vitro* de ce sérum est très intéressant. Il possède des propriétés antitryptiques un peu plus marquées que celles du sérum d'oie normale, qui, à ce point de vue, se montre

très irrégulier. Mais surtout il possède la propriété d'accélérer dans de grandes proportions la sécrétion de la pancréatine par les cellules du pancréas frais.

On sait en effet que le pancréas prélevé sur un animal vivant ne contient que peu ou pas de trypsine, et que celle-ci apparaît seulement après un temps plus ou moins long, suivant les conditions de température, d'acidité, etc. L'adjonction, à la macération, de sérum d'oie ayant reçu des émulsions de cellules pancréatiques provoque au contraire, par une véritable cytolysé, la mise en liberté très rapide de la trypsine. Le sérum est donc à la fois antitryptique et trypsinogène.

Ce double pouvoir, joint à la notion des propriétés escarriantes de la trypsine, explique les résultats obtenus par M. Surmont, c'est-à-dire la production d'escarres par le mélange de pancréas frais et de sérum antipancréatique. La même sécrétion de trypsine se produisant dans l'organisme doit donner lieu aux nécroses que l'on observe par l'inoculation sous-cutanée de pancréas frais aux animaux ayant déjà reçu de semblables injections, et dont le sérum est devenu trypsinogène.

La trypsine ainsi produite réagit à son tour sur l'organisme, et amène l'augmentation secondaire du pouvoir antitryptique du sérum. Il serait intéressant d'immuniser d'abord fortement l'animal contre la trypsine, puis de lui injecter le pancréas frais : on pourrait ainsi pousser beaucoup plus loin les inoculations, et obtenir peut-être un sérum antipancréatique beaucoup plus puissant.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, j'ai évité autant que possible de sortir de l'exposition simple des faits que j'ai observés. Leur interprétation en effet me semble en découler facilement. L'introduction dans l'économie de la trypsine capable de modifier profondément l'albumine vivante, provoque immédiatement un processus de défense. Ce processus consiste en l'exsudation du sérum du sang sous l'influence d'un processus vaso-moteur. Cette exsudation a pour double effet : 1° de s'opposer à la pénétration de la trypsine; 2° d'en neutraliser ensuite les effets. Si

cette exsudation peut se faire librement comme dans la cavité péritonéale, ce processus de neutralisation peut être atteint par l'action du sérum normal; il peut l'être également dans le tissu cellulaire sous-cutané si la dose de trypsine est modérée. En cas contraire survient la nécrose, qui aboutit également au cantonnement et à l'élimination de l'agent pathogène. A la suite d'attaques répétées, le processus de défense se perfectionne par l'augmentation du pouvoir antitryptique du sérum, dont une beaucoup plus faible quantité suffit à la neutralisation de la trypsine injectée. La réaction locale n'aboutit donc plus à la nécrose, mais à la résorption de la trypsine neutralisée par suite de la disparition de l'action vaso-motrice exercée par la trypsine libre. L'inoculation simultanée du sérum d'animal vacciné et de trypsine en proportions déterminées est en effet résorbée sans aucune action vaso-motrice.

Quant à la manière dont agit le sérum sur la trypsine, elle est entièrement symétrique à l'action des sensibilisatrices, et je trouve le nom d'insensibilisatrices, que donne Mesnil aux substances de cet ordre, très expressif et correspondant bien à l'idée qui me semble résulter logiquement de ces recherches.

DE LA MORPHOLOGIE DU SANG

DES FŒTUS DE LAPIN ET DE COBAYE

ET

DE L'INFLUENCE DE L'INFECTION DE LA FEMELLE GRAVIDE

SUR LE SANG DE SES FŒTUS

PAR LE PROF. N. TSCHISTOVITSCH ET LE D^r YOUREWITSCH

(Laboratoire du professeur N. Tschistovitch, à l'Académie impériale de médecine militaire de Saint-Pétersbourg.)

Au cours de la vie intra-utérine, le placenta sert de lien entre le fœtus et la mère. Le sang maternel ne se mêle pas à celui du fœtus dans le placenta : les villosités choriales contenant des capillaires fœtaux nagent dans les sinus veineux de la partie maternelle du placenta. Le sang fœtal est séparé du sang maternel par la paroi du capillaire de la villosité, ainsi que par le revêtement endothélial de cette dernière.

Quand la mère est infectée, les microbes et les toxines qui circulent dans son sang sont séparés, comme par une barrière, du sang fœtal. Cependant cette barrière n'est pas infranchissable; le passage des microbes dans le sang fœtal a été constaté maintes fois (Straus et Chamberland, Perroncito, Charrin et Duclert, Kroner, Malvoz, Arloing, Cornevin et Thomas, Foa et Bordoni-Uffreduzzi, Kruse et Pansini, Lubarsch, etc.)

Il n'est pas rare de voir les microbes pénétrer dans le sang fœtal chez les femelles gravides infectées par le pneumocoque, le staphylocoque et par quelques autres bactéries. Les produits microbiens solubles, les toxines, circulant dans le sang maternel, rencontrent encore beaucoup moins de difficultés à passer à travers les parois des villosités. Ces intoxications intra-utérines expliquent la mort fréquente du fœtus au cours d'une maladie infectieuse de la mère, ainsi que les nombreuses anomalies de

développement (Charrin et Gley et d'autres). On s'est très peu occupé jusqu'à présent de la manière dont le fœtus se défend pendant la maladie maternelle. L'attention des auteurs a été surtout attirée sur le rôle joué par le placenta; c'est à peine si l'on a parlé des processus qui, dans ce cas, ont lieu dans le fœtus lui-même.

Voulant éclairer ces phénomènes complexes, nous nous sommes d'abord mis à étudier les modifications morphologiques que subit le sang fœtal, quand, au cours d'une infection de la mère, les toxines, et parfois les microbes eux-mêmes, passent à travers le filtre placentaire dans le sang fœtal.

La réaction leucocytaire des animaux dans les différentes infections de la vie intra-utérine a été beaucoup étudiée. Elle constitue un phénomène constant et exerce une influence considérable sur l'animal. Ainsi, l'étude de cette réaction dans l'infection pneumococcique a permis à un de nous (déjà en 1891¹) d'établir la relation entre l'intensité de cette réaction et la virulence du microbe infectant, et de montrer que la propriété que présente l'organisme de réagir contre l'infection par une leucocytose intense est une des conditions essentielles du triomphe de l'animal infecté sur les microbes.

Il a été démontré depuis, par de nombreuses expériences, qu'on peut provoquer des modifications dans le nombre des leucocytes au moyen d'une série de substances très diverses, que ces dernières soient suspendues ou dissoutes dans le sang. La réaction qui suit l'injection intravasculaire d'une de ces substances présente deux phases : celle de diminution du nombre des leucocytes (hypoleucocytose) qui survient immédiatement après l'injection, et celle d'augmentation ultérieure (hyperleucocytose).

Nous n'allons pas discuter ici les causes de ces phénomènes ni le mécanisme de leur origine; cette question compte pour elle seule toute une littérature. Tout en expliquant ces phénomènes de façons différentes, les auteurs reconnaissent leur

1. N. TSCHISTOVITSCH. Contribution à l'étude de la pneumonie croupale. De la modification des globules blancs dans la pneumonie, *Gazette d'hôpital de Botkine*, 1891, et *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891.

Idem, Du nombre de leucocytes du sang dans les pneumonies croupales à issue fatale. Communication à la Société des médecins russes, 2 déc. 1893, et *Archives des sciences biologiques*, t. II, n° 5, 1894.

constance, et il serait difficile de méconnaître aujourd'hui que la réaction sanguine est un des phénomènes de défense de l'organisme.

Nous nous sommes demandé si le fœtus réagit également par l'hypoleucocytose et l'hyperleucocytose, au cas où des toxines bactériennes franchiraient la barrière des villosités choriales pour pénétrer dans son sang. C'est pour élucider cette question que nous avons entrepris ce travail. Mais, déjà au commencement de notre étude, nous nous sommes heurtés à cette difficulté, que le sang normal du fœtus des animaux dont on se sert ordinairement pour les expériences de laboratoire est encore très peu étudié. Nous n'avons trouvé quelques données sur la morphologie du sang du fœtus de lapin ou de cobaye que dans les travaux de Cohnstein et Zuntz¹, et dans celui du professeur Hayem².

Cohnstein et Zuntz n'ont examiné que les globules rouges des fœtus de chien, de lapin et de cobaye. Ils ont constaté que le nombre des globules rouges est très petit dans la première période de la vie intra-utérine : 1 millimètre cube de sang de fœtus de lapin, de 0 gr. 8 à 2 gr. 6, donnait seulement 376,000 à 500,000 globules rouges. Plus tard, au cours de la vie intra-utérine, le nombre d'érythrocytes augmente petit à petit, pour atteindre 3,200,000 à 4,000,000 chez les fœtus de 43 à 45 grammes. Le sang de fœtus de cobaye, pesant de 25 gr. 5 à 34 gr. 1, comptait de 3,521,700 à 3,498,000 globules rouges par millimètre cube.

On trouve beaucoup plus de détails sur le sang de fœtus de lapin dans le livre du professeur Hayem. Le sang des petits fœtus (20 à 24 milligrammes) est très pauvre en éléments figurés. Les globules rouges, de dimensions et de formes différentes, ne se mettent pas en piles de monnaie. Plusieurs, parmi eux, possèdent des noyaux. Ces derniers sont plus pauvres en hémoglobine que les globules rouges non nucléés. Hayem n'a trouvé que très peu de globules blancs dans le sang des fœtus de lapin. C'étaient des polynucléaires ou bien des mononucléaires à noyaux polymorphes (2^{me} variété de Hayem), ou bien

1. COHNSTEIN et ZUNTZ, Untersuchungen über das Blut, den Kreislauf und die Athmung beim Säugethieren-Fœtus, *Archiv f. Physiologie*, Bd. XXXIV, s. 173, 1884.

2. HAYEM, *Du sang et de ses altérations anatomiques*, 1889, p. 545.

encore des leucocytes à grosses granulations (3^{me} variété). L'auteur n'indique pas quel était le nombre total des leucocytes, pas plus que les proportions dans lesquelles se trouvaient les différentes variétés.

Étant donné ce peu de faits sur la morphologie du sang des fœtus normaux, nous étions obligés de commencer notre travail par l'étude du sang fœtal normal. Cette étude a surtout porté sur le sang des fœtus de lapin et de cobaye. La première partie de ce travail a été exécutée l'année dernière par l'un de nous en collaboration avec le Dr W. P. Pivovarov¹ et est déjà publiée. Nous devons mentionner ici les principaux résultats de ce travail, sans quoi il serait difficile de comprendre ce qui suit. Nous indiquerons en même temps la manière dont les expériences ont été exécutées, car nous avons suivi la même manière de faire dans notre présent travail.

II

MORPHOLOGIE DU SANG DES FŒTUS NORMAUX DE LAPIN

Les lapines pleines subissaient, au cours de la deuxième période de leur grossesse, l'opération césarienne. La corne utérine ouverte, on incisait les membranes fœtales et on recueillait le fœtus dans de la gaze trempée préalablement dans de l'eau physiologique, chauffée pour éviter le refroidissement. Puis, on séchait la peau au niveau des veines transparentes du cou; on incisait la peau, la veine, et on recueillait un peu de sang qui s'écoulait de la veine, dans le mélangeur, pour compter les globules rouges, en même temps qu'on faisait quelques frottis de sang sur les lames qu'on fixait et colorait ensuite. Pendant toute cette opération, on avait soin de ne pas séparer le fœtus du placenta, mais il arrivait parfois que ce dernier se détachait tout seul de la paroi utérine, et le fœtus commençait à faire des mouvements respiratoires. La prise du sang et la préparation de quelques frottis ne demandaient en tout que quelques minutes.

1. N. Tschistovitsch et W. Pivovarov. Des modifications du sang de lapin pendant la vie intra-utérine et dans les premiers jours qui suivent la naissance, *Archives russes de pathologie*, 1900, et *Archiv f. mikroskopische Anatomie*, 1900.

On comptait les globules sanguins comme d'habitude, au moyen de l'appareil de Thoma-Zeiss. Pour compter les globules rouges, on diluait le sang dans 200 parties de liquide de Hayem¹; pour les globules blancs, on diluait le sang dans 20 parties d'acide acétique à 1/3 0/0. On comptait sur les champs du microscope préalablement mesurés (objectif D de Zeiss, oculaire 4) et on calculait le nombre des leucocytes sur 5-6 champs au moins. En comptant les globules blancs, nous avons compris également les globules rouges nucléés. Pour préciser d'une façon exacte le nombre des globules blancs, nous avons étudié dans quelles proportions se trouvent ces deux éléments nucléés sur des préparations desséchées et colorées. Connaissant cette proportion, ainsi que le nombre global d'éléments nucléés du sang, il nous a été facile de déterminer le nombre exact des globules blancs et des globules rouges nucléés séparément.

On fixait les frottis de sang d'après Ehrlich à 110-120°, et on les colorait avec le triacide d'Ehrlich (orange G, fuchsine acide et vert de méthyle) modifié par Egorovsky².

Nous avons trouvé chez les fœtus de lapin quatre principales variétés de leucocytes :

1° Leucocytes polynucléaires à granulations pseudo-éosinophiles. Les noyaux de ces leucocytes sont nombreux ou polymorphes. Par l'aspect de leurs granulations, ces leucocytes occupent la place intermédiaire entre les neutrophiles et les éosinophiles de l'homme; leurs granulations sont plus nombreuses et plus grandes que celles des neutrophiles, tout en étant plus petites que celles des éosinophiles de l'homme. On en trouve parmi eux quelques-uns possédant de grosses granulations et ressemblant tout à fait à de véritables éosinophiles ;

2° Leucocytes polynucléaires (formes de passage) : grands leucocytes à noyaux multiples ou polymorphes, comme dans la première variété, mais avec un protoplasma tout à fait transparent, incolore ou bien légèrement coloré en rose. Ces leucocytes sont des formes de passage au troisième groupe ;

1. Liquide de Hayem	{	Eau distillée.....	200 grammes.
		Chlorure de sodium.....	1 —
		Sulfate de soude.....	5 —
		Bichlorure de mercure ..	0 gr. 5

2. EGOROVSKY. *Des Modifications morphologiques des globules blancs des vaisseaux sanguins*. Thèse (en russe), 1894.

3° Grands leucocytes mononucléaires. Grands leucocytes à grand noyau ovale et à protoplasma non granuleux;

4° Lymphocytes. Petits leucocytes à noyau rond et facilement colorable et à protoplasma faiblement accusé sous forme d'une couronne. On rencontre parfois de gros lymphocytes.

On trouve de temps en temps des pseudo-éosinophiles en désagrégation et des polynucléaires vacuolisés.

Le tableau I donne les résultats de l'examen du sang normal des fœtus de lapin.

Nous avons examiné les fœtus, pour la plupart gros, bien formés, longs de 4, 5 à 11 centimètres, et pesant de 24 à 40 grammes. Le poids de ces fœtus était en réalité un peu plus grand, car nous les pesions après une perte considérable de sang.

Le nombre des globules rouges oscille chez eux entre 2,515,000 et 4,391,600 pour 1 millimètre cube. Il y avait dans le nombre de 484 à 2,011 globules rouges nucléés.

Les globules blancs étaient très peu nombreux, de 202 à 1,645 dans 1 millimètre cube. Voici les proportions des différentes variétés de globules blancs :

Polynucléaires pseudo-éosinophiles

avec quelques éosinophiles : 41,3 à 62,7 0/0 (152 à 839 pour 1 mm. c.)

Leucocytes à forme de passage. 2,9-12 0/0 (11-132 pour 1 mm. c.)

Grands mononucléaires..... 11,8-28 0/0 (45-291 pour 1 mm. c.)

Lymphocytes..... 4-26,5 0/0 (30- 363 pour 1 mm. c.)

III

MORPHOLOGIE DU SANG DES FŒTUS NORMAUX DE COBAYE

Nous nous sommes servis pour nos expériences de cobayes femelles arrivées à la dernière période de la grossesse, et cela pour opérer, autant que possible, sur de gros fœtus. Comme on le voit sur le tableau II, les fœtus mesuraient en long, du bout du museau à l'extrémité du corps, de 8^{cm},2 à 11 centimètres; leur poids était de 17^{gr},2 à 40^{gr},5. Le plus souvent c'étaient des fœtus presque complètement arrivés à terme. Nous avons suivi la même technique que dans l'étude du sang des fœtus de lapin.

Nous avons voulu classer les leucocytes dans cette étude,

comme dans l'étude précédente pour les fœtus de lapin; mais nous avons constaté que le sang des fœtus de cobaye diffère assez essentiellement du sang de lapin, aussi bien par rapport aux différentes variétés des leucocytes que par rapport à leur aspect extérieur. Comme le fœtus de lapin, celui de cobaye contient très peu de globules blancs. On ne compte que 511 à 1587 de ces derniers dans 1 millimètre cube.

Tandis que le sang des fœtus de lapin contient le plus de polynucléaires pseudo-éosinophiles, celui des fœtus de cobaye ne présente que très peu de leucocytes à protoplasma granuleux, 6 à 30 pour 1 millimètre cube. C'est seulement chez des fœtus arrivés à terme qu'on en trouvait de 122 à 141 par millimètre cube. Ces leucocytes se distinguaient des leucocytes de lapin par leur aspect : les granulations de leur protoplasma étaient ordinairement plus petites et se coloraient non pas en rose, mais en violet (comme les neutrophiles); parfois même les granulations des polynucléaires prenaient la teinte violet foncé (basophiles). Les noyaux des polynucléaires se coloraient beaucoup plus faiblement que ceux des neutrophiles de l'homme.

On ne trouvait que très peu de polynucléaires à protoplasma transparent, sans granulations (formes de passage), de 9 à 34 par millimètre cube; parfois même on n'en trouvait pas du tout.

On comptait déjà beaucoup plus de grands mononucléaires, de 55 à 408 par millimètre cube.

Mais ce sont les lymphocytes qui sont les plus nombreux dans le sang de fœtus de cobaye; ils constituent la principale partie de la masse des globules blancs. On en rencontrait de 298 à 1305.

Voici les proportions dans lesquelles on trouvait les différentes variétés de leucocytes :

<i>Leucocytes polynucléaires</i> à protoplasma granuleux (pseudo éosinophiles, neutrophiles, basophiles)	0,7 — 9,9 0/0
<i>Leucocytes polynucléaires</i> (formes de passage) à protoplasma clair ou à peine coloré	0 — 6,7 0/0
<i>Gros mononucléaires</i>	9,9 — 42,5 0/0
<i>Lymphocytes</i>	53,2 — 88,2 0/0

On trouvait toujours dans le sang des fœtus de cobaye, ainsi que dans le sang des fœtus de lapin, des hématies nucléées, bien

qu'en quantité moindre que chez ces derniers. Leur nombre variait de 100 à 906 par millimètre cube.

Le nombre général des globules rouges oscillait entre 4,560,000 et 6,230,000.

IV

MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DU SANG DES FOETUS DE LAPIN ET DE COBAYE DANS L'INFECTION DES MÈRES PLEINES PAR LES DIFFÉRENTS MICROBES, AINSI QUE DANS LE COURS D'EMPOISONNEMENT PAR LES TOXINES MICROBIENNES.

Connaissant la morphologie du sang des fœtus normaux de lapin et de cobaye, nous avons entrepris l'étude des modifications que présente le sang des fœtus, lorsque l'animal gravis subit une infection quelconque.

Nous avons conduit nos expériences de la façon suivante :

On comptait les globules blancs du sang pris dans la veine auriculaire de la femelle gravis. Ceci fait, on injectait dans la veine auriculaire, ou bien sous la peau, une culture ou une toxine quelconque. Nous nous sommes servis dans nos expériences des cultures en bouillon du diplocoque de Fränkel, de celles du *staphylocoque* jaune, du bacille pyocyanique et de la toxine diphtérique¹.

A des dates différentes après le début de l'infection de l'animal, nous recommencions à compter les globules blancs, et si nous trouvions l'hypo — ou l'hyperleucocytose, nous pratiquions l'opération césarienne, en suivant les règles qui sont indiquées plus haut. Les modifications du sang maternel nous indiquaient que la culture microbienne ou bien la toxine injectée par nous avait produit une action évidente sur le sang et les organes hématopoïétiques de la mère. On pouvait donc déjà s'attendre à trouver des modifications correspondantes dans le sang fœtal.

On pratiquait la laparotomie ainsi que l'examen du sang fœtal quelques heures après l'infection ou bien le lendemain matin. Dans un cas, la lapine mère a commencé à mettre bas les petits une heure après avoir reçu une injection intraveineuse de toxine diphtérique. Le sang de ces petits lapins a été étudié immédiatement après leur naissance.

1. On filtrait à travers le filtre Chamberland des cultures en bouillon de veau de bacille diphtérique de 14 jours. 1 c. c. (par kilo de lapin) de cette toxine introduite dans le sang tuait un lapin en 19 heures.

On a examiné en tout le sang de 17 fœtus.

Dans nos expériences sur des lapins, nous pratiquions l'opération césarienne quand les mères présentaient une hyperleucocytose très nette, provoquée dans un cas par l'injection intraveineuse d'une culture en bouillon de 24 heures de diplocoques de Fränkel; dans un autre, par l'injection intraveineuse de toxine diphtérique. Quant au cas mentionné plus haut, la leucocytose y a été probablement provoquée par l'action simultanée de la toxine diphtérique et du travail d'enfantement.

Dans un cas seulement, on a pratiqué l'opération césarienne sur des cobayes au moment de l'hyperleucocytose survenue à la suite d'une injection sous-cutanée du staphylocoque jaune. Dans les autres cas, cette opération a été exécutée pendant la période d'hypoleucocytose que les cobayes présentaient après l'injection sous-cutanée des cultures en bouillon de bacille pyocyanique et de staphylocoque pyogène doré. Les résultats de nos expériences sont indiqués dans les tableaux III et IV.

Arrêtons-nous d'abord sur les expériences pratiquées sur des lapines mères. Comparons le sang des fœtus de lapines infectées avec celui des fœtus normaux, en prenant pour comparaison, autant que possible, les fœtus de même poids et de même taille. Quant au poids, il faut avoir en vue, comme nous l'avons déjà dit plus haut, qu'il est inférieur au poids réel, et cela pour tous les fœtus en général, à cause de leur plus ou moins grande perte de sang. Il nous a été impossible de peser les fœtus avant la prise du sang, car nous tenions surtout à recueillir le sang le plus vite possible, sans séparer le fœtus du placenta et sans lui donner le temps de se refroidir; nous voulions, en un mot, nous procurer du sang fœtal non modifié, tel qu'il existe chez le fœtus encore vivant dans la cavité utérine de la mère.

Le tableau I, indiquant la morphologie du sang des fœtus de lapins normaux, nous montre que les fœtus de 30 à 40 grammes et ayant 9 à 11 centimètres de long ont en tout de 266 à 1,645 leucocytes par millimètre cube. Ce dernier chiffre, qui est si élevé, n'a été trouvé que chez un fœtus normal; chez tous les autres, le nombre de leucocytes variait entre 266 et 835 par mm. c.

Le même fait, nous le constatons dans le tableau III: sur 9 fœtus provenant de lapines infectées avec des diplocoques de Fränkel ou empoisonnées avec la toxine diphtérique, dans un

cas seulement nous trouvons dans le sang fœtal 1,213 leucocytes par millimètre cube; tous les autres fœtus donnaient de 420 à 962. Par conséquent, le nombre général des leucocytes oscillait ici dans les mêmes limites que chez les fœtus normaux.

L'hyperleucocytose des femelles pleines, provoquée par l'infection ou par l'intoxication avec de la toxine bactérienne, n'a pas été suivie de modifications correspondantes dans le nombre des leucocytes du sang fœtal.

Voyons maintenant si la maladie de la mère n'a pas retenti sur le nombre des différentes variétés de leucocytes du sang fœtal.

En examinant les rubriques correspondantes des tableaux I et III, nous constatons des différences considérables dans les nombres de leucocytes d'une même espèce, même chez les fœtus de la même mère, et cela est exact aussi bien pour les fœtus pathologiques que pour les fœtus normaux. Le nombre d'une variété quelconque de leucocytes dans ces deux catégories de fœtus oscillait approximativement dans les mêmes limites. On peut cependant remarquer que les fœtus des lapines infectées donnaient souvent un pourcentage plus considérable de polynucléaires pseudo-éosinophiles et de lymphocytes que les fœtus normaux; mais cette différence était très peu marquée.

Le nombre de globules rouges, ainsi que d'érythrocytes nucléés, ne différait pas non plus de ce que nous avons trouvé chez les fœtus normaux.

Ainsi, dans nos expériences sur les lapins, *le processus toxico-infectieux de la mère n'a pas influé d'une façon essentielle sur les caractères morphologiques du sang de fœtus.*

Passons maintenant à l'examen du sang des fœtus de cobayes infectées par l'injection sous-cutanée de cultures en bouillon de bacille pyocyanique et de staphylocoque doré. Une de ces femelles gravides présentait au moment de l'opération césarienne de l'hyperleucocytose (22,916 par millimètre cube), d'autres de l'hypleucocytose. (Voir le tableau IV.)

Le nombre général des globules blancs chez tous les fœtus était aussi petit que chez les fœtus normaux (de 502 à 1,314 par millimètre cube); et il était impossible de trouver une relation entre l'état des éléments figurés du sang de fœtus

et celui du sang maternel. Ainsi, par exemple, nous avons trouvé chez un fœtus provenant d'un cobaye opéré dans la période d'hyperleucocytose, 502 leucocytes, et nous en avons constaté presque autant (579 et 594) chez deux fœtus de cobaye opérés dans le stade d'hypoleucocytose.

Ici également, comme pour les lapins, nous trouvons des différences considérables dans la morphologie du sang de deux fœtus issus de la même mère.

Les rapports numériques des diverses variétés de leucocytes diffèrent peu de ce que nous avons vu pour les fœtus normaux de cobaye. Nous avons trouvé très peu de polynucléaires à protoplasme granuleux, encore moins que chez les fœtus normaux. Chez deux fœtus, nous n'avons pas pu déceler la présence de cette variété de leucocytes, malgré l'examen le plus soigné du sang. Il y avait également peu de leucocytes à forme de passage.

Presque tous les leucocytes appartenaient à la variété de lymphocytes, dont le nombre, aussi bien absolu que relatif, a évidemment peu augmenté.

Le nombre des grands mononucléaires a été le même que chez les fœtus normaux.

Les globules rouges ne différaient pas de ceux des fœtus normaux par leur nombre, pas plus que par la quantité d'érythrocytes nucléés.

En réunissant les données que nous a fournies l'étude du sang des fœtus provenant des lapines et des cobayes infectées avec différents microbes ou bien empoisonnées avec la toxine bactérienne, nous trouvons, comme phénomène général, l'absence de modifications morphologiques marquées dans le sang fœtal, au moment même où chez la mère, sous l'influence de l'infection ou de l'intoxication en question, apparaît l'hypo- ou l'hyperleucocytose. Il serait très simple, paraît-il, d'expliquer cette absence de réaction de la part du fœtus, par ce fait que dans nos expériences rien ne passait dans le sang du fœtus. Nous introduisions, en effet, les cultures ou la toxine directement dans le sang ou dans le système lymphatique. Dans le sang de fœtus il n'aurait pu pénétrer que ce qui n'a pas été détruit ou rendu inoffensif dans le sang de la mère et qui n'a pas été retenu par le filtre placentaire. Cette explication nous paraît cependant insuffisante dans notre cas.

Nous avons déjà mentionné les cas de maladie ou de mort intra-utérine de fœtus qui surviennent au cours d'une infection de la mère; nous avons parlé également des recherches expérimentales qui démontrent que le placenta peut être franchi non seulement par les toxines, mais aussi, ce qui n'est pas rare, par les microbes eux-mêmes. Nous avons manqué, justement, quelques expériences à cause de l'action trop violente des toxines sur les fœtus, et de la mort qui frappait ces derniers dans l'utérus même, avant que nous ayons pu examiner leur sang.

Aussi, ne nous restait-il qu'une explication, à savoir que le fœtus ne peut pas manifester de réaction sanguine de défense, ce qui a été déjà supposé par l'un de nous dans le travail mentionné plus haut¹.

Le petit nombre de leucocytes qu'on trouve dans le sang de fœtus au cours de la vie intra-utérine, nous faisait déjà supposer que la défense phagocytaire chez ce dernier est peu développée, et que cette propriété se manifeste surtout au moment de la mise du fœtus au monde. Tant que le fœtus reste dans l'utérus, il est protégé contre les infections par l'organisme maternel, et n'a pas besoin de posséder une armée de phagocytes à lui. Nos recherches actuelles nous amènent à la même conclusion : après avoir fait circuler dans le sang maternel la toxine bactérienne, nous n'avons pas pu déceler du côté du fœtus de réaction morphologique du sang, tant soit peu marquée, bien que le fœtus ait été souvent atteint et que même parfois il périssait.

Nous publierons ultérieurement nos recherches sur le passage dans le sang fœtal des antitoxines, des bactériolysines, des agglutinines et d'autres substances défensives et anti-infectieuses¹.

1. TSCHISTOVITSCH und V. PIVOVAROV, *Arch. f. Mikroskopische Anatomie*, 1900.

Dans un travail récemment paru dans les *Archives de sciences biologiques* de Saint-Petersbourg, C. Dzerjowski nota un fait très intéressant : le sang des fœtus du cheval, de la chèvre et du chien immunisés contre la diphtérie ne contenait pas d'antitoxines. Se basant sur ce fait, l'auteur conclut que les toxines ne passent non plus dans le sang du fœtus à travers le placenta, puisque dans le cas contraire nous y aurions aussi trouvé les antitoxines. Cette dernière conclusion nous paraît prématurée pour le moment, l'auteur ne nous ayant fourni aucune preuve que le fœtus fût en général capable de produire les antitoxines.

TABLEAU I
FOETUS DE LAPINS NORMAUX

POIDS et longueur du fœtus.	NOMBRE général de glo- bules rouges.	NOMBRE des globules rouges nucles.	NOMBRE général de leucocytes	NOMBRE de polynucléaires pseudo- éosinophiles	NOMBRE de leucocytes à forme de passage.	NOMBRE de grands mono- claires.	NOMBRE polynucléaires pseudo- éosinophiles.	0/0 FORMES de passage.	0/0 gros mononu- cléaires.	0/0 lympho- cytes.
N° 1. Long. 4 c. 5.	2.515.000	4.360	202							
N° 2. Poids 40 gr.	3.545.000	753	624	258	65	150	44.3	40.4	21.1	24.1
N° 3. Poids 35 gr.	4.070.000	532	266	152	21	35	57.0	8.0	21.8	43.2
N° 4. Poids 30 gr.	4.720.000	889	663	332	47	442	48.5	7.1	22.2	22.2
N° 5. Poids 26 gr.	4.475.000	488	380	223	41	45	58.7	2.9	41.8	26.5
N° 6. Poids 24 gr.	3.005.000									
N° 7.		555	515	299	96	408	58.4	6.9	23.0	41.9
N° 8.	3.360.000	484	470	295	24	412	62.7	5.1	23.9	8.3
N° 9. { Poids 40 gr. Long. 40 c. 5.	3.875.000	4.018	740	444	59	207	60.0	8.0	28.0	4.0
N° 10. { Poids 30 gr. Long. 40 c. 5.	4.394.600	2.014	755	343	69	483	45.4	9.1	24.2	21.2
N° 11. { Poids 30 gr. Long. 40 c.		699	1.645	859	132	294	52.2	8.0	47.7	22.1
N° 12. { Poids 40 gr. 2. Long. 44 c. 5.	4.650.000	4.704	835	428	402	424	51.3	12.2	44.8	21.6

Le fœtus n° 1 vient de la 1^{re} lapine, les fœtus nos 2 et 3 viennent de la 2^e, nos 4 et 5 de la 3^e, nos 6 et 7 de la 4^e, nos 9, 10, 11 et 12 de la 5^e.

TABLEAU II
FŒTUS DE COBAYES NORMAUX

POIDS et longueur du fœtus.	NOMBRE général de glo- bules rouges.	NOMBRE de globules rouges nucléés	NOMBRE général de leucocytes.	NOMBRE de polymorphes à proto- plasma gra- nuleux.	NOMBRE de leucocytes à fin de passage.	NOMBRE de gros mononu- cléaires.	NOMBRE de lym- phocytes.	0/0 de leuco- cytes granuleux.	0/0 de leuco- cytes à forme de passage.	0/0 gros mononu- cléaires.	0/0 lympho- cytes.
N° 1. { Long. 8 c. 8. { Poids 49 gr. 5.	5.170.000	280	830	6	30	353	444	0.7	3.6	42.5	53.2
N° 2. { Long. 9 cent. { Poids 49 gr. 7.	4.560.000	414	769	24	32	485	528	3.0	4.1	24.2	68.6
N° 3. { Long. 9 cent. { Poids 49 gr. 8.		788	952	29	45	343	565	3.1	4.6	36.0	59.3
N° 4. { Long. 9 cent. { Poids 47 gr. 2.		809	514	41	32	470	298	2.4	6.3	33.3	58.3
N° 5. { Long. 8 c. 2. { Poids 18 gr. 5.	4.880.000	737	4.068	0	9	408	651	0	0.8	38.2	61.0
N° 6. { Long. 8 cent. { Poids 18 gr. 2.		906	517	0	34	415	367	0	6.7	22.2	64.4
N° 7. { Long. 41 cent. { Poids 40 gr. 5.	5.966.000	184	1.587	422	0	160	1.305	7.7	0	40.1	82.2
N° 8. { Long. 44 cent. { Poids 35 gr.	6.230.000	240	628	49	0	55	554	3.0	0	8.8	88.2
N° 9. { Long. 40 cent. { Poids 38 gr. 5.	4.833.000	400	4.427	444	0	144	4.445	9.9	0	9.9	80.2

Les fœtus nos 1, 2, 3, proviennent de la première cobaye femelle, les nos 4, 5 et 6 de la 2^e, les nos 7, 8 et 9 de la 3^e.

TABLEAU III
FOETUS DE LAPINES INFECTÉES

Poids et longueur des foetus.	Nombre général de globules rouges.	Nombre de globules rouges nucléés.	Nombre général de leucocytes.	Nombre de poly- nucléaires pseudo- eosinophiles.	Nombre de leuco- cytes à forme de passage.	Nombre de gros mononucléaires.	Nombre de lym- phocytes.	poly- nucléaires pseudo- eosinophiles.	leucocytes à forme de passage.	gros mononu- cléaires.	lymphocytes.
<p><i>Expérience VI.</i> — A 9 heures du matin on trouve dans le sang de la veine auriculaire 8,449 leucocytes par mill. cube. A 9 h. 50, injection intraveineuse de toxine diphtérique.</p> <p>10 h 55. Commencement de l'accouchement. 2 foetus sont nés; ils donnent 11,424 leucocytes par mill. cube. Puis naissent encore 2 foetus. Leur sang a été examiné immédiatement après la naissance.</p> <p><i>Expérience VII.</i> — A 9 heures du matin on trouve dans le sang de la veine auriculaire de lapine 9,672 leucocytes.</p> <p>A 9 h. 35, injection intraveineuse de 1/2 c. c. de culture en bouillon de diplocoque de Fränkel.</p> <p>A 11 h. 45, 12,612 leucocytes.</p> <p>A 4 h. 15, opération césarienne et examen du sang du foetus.</p> <p><i>Expérience VIII.</i> — A 10 heures du matin on trouve dans le sang de la veine auriculaire 9,134 leucocytes.</p> <p>A 10 h. 13, injection intraveineuse de 1/3 de c. c. de toxine diphtérique. A 6 heures du soir, on trouve dans le sang de la veine auriculaire 13,802 leucocytes par mill. cube.</p> <p>Immédiatement après cet examen, opération césarienne et examen du sang foetal.</p>											
N° 1. { Long. 10 cent. { Poids 33 gr.	3.980.000	687	541	328	46	49	148	60.6	3.0	9.4	27.3
N° 2. { Long. 9 c. 5. { Poids 32 gr.	4.420.000	590	600	445	29	29	97	74.2	4.8	4.8	46.4
N° 3. { Long. 10 c. 5. { Poids 39 gr.		1.532	420	452	54	22	492	36.2	12.8	5.3	45.7
N° 4. { Long. 10 c. 5. { Poids 33 gr. 4.	3.712.500	367	466	354	49	43	80	76.0	4.0	2.7	17.3
N° 5 { Long. 9 c. 4. { Poids 32 gr. 1.	3.457.600	746	746	372	42	42	149	68.6	5.7	5.7	20.0
N° 6. { Long. 10 c. 9. { Poids 36 gr. 6.		597	653	451	41	45	146	69.0	4.7	6.9	22.4
N° 7. { Long. 10 c. 5. { Poids 41 gr. 7.	3.840.000	1.205	4.213	821	66	56	270	67.7	5.4	4.6	22.3
N° 8. { Long. 9 c. 5. { Poids 37 gr. 7.	4.012.500	1.364	962	671	21	408	462	69.7	2.2	11.2	16.9
N° 9. { Long. 10 cent. { Poids 43 gr. 7.	4.290.000	1.363	536	268	44	89	465	50.0	2.6	16.6	30.8

Les foetus nos 1, 2 et 3 proviennent de la 1^{re} lapine, les nos 4, 5 et 6 de la 2^e, les nos 7, 8 et 9 de la 3^e.

TABLEAU IV
FOETUS DE COBAYES INFECTÉES

Poids et longueur des fœtus.	Nombre général de globules rouges.	Nombre de globules rouges nucléés.	Nombre général de leucocytes.	Nombre de poly- nucléaires granu- laires.	Nombre de leuco- cytes à forme de passage.	Nombre de gros mononucéaires.	Nombre de lymphocytes.	0/0 polynucléaires granuleux.	0/0 leucocytes à forme de passage.	gros mononu- cléaires.	0/0 lymphocytes.	
N° 1. { Long. 4 c. 5. Poids 4 gr. 1.		41.307	502*									Expérience III — Le 16/iii, à 1 h. on trouve dans le sang de cobaye 11,940 leuc. Inj. sous-cutanée de 1/3 de c. c. de culture de bouillon de staphylopyogène doré. Le 17/iii matin, avant l'opération césarienne, 22,816 leuc.
N° 2. { Long. 10 c. 4. Poids 36 gr.	4.389.600	1.898	594	0	85	65	444	0	14.2	14.0	74.8	Expérience IV. — 28/iii à 10 h. matin, dans le sang veineux de cobaye pleine 10,074 leuc. Inj. sous-cutanée de 1/3 de c. c. de culture en bouillon de bacille pyocyanique. 29/iii matin av. l'opération 2,976 leuc. par mil. c.
N° 3. { Long. 10 c. Poids 35 gr. 2.	5.485.000	1.861	1.489	44	86	200	889	1.2	7.2	16.8	74.7	
N° 4. { Long. 11 c. 8. Poids 42 gr. 7.	5.410.000	437	1.344	138	59	39	1.078	10.5	4.5	3.0	82.0	Expérience V. — Le 3/iv à 10 h. matin dans le sang de cobaye 7,366 leuc. A 11 h. 45 inj. sous-cutanée de 1/2 c. c. de culture en bouillon de staphyl. pyogène doré. Le 4/iv 9 h. matin av. l'opération, 2,120 leuc. par mil. c.
N° 5. { Long. 11 c. 6. Poids 40 gr. 3.	6.320.000	417	1.033	44	44	69	876	4.2	4.2	6.7	84.8	
N° 6. { Long. 11 c. 5. Poids 37 gr. 4.	5.633.000	46	579	24	42	57	486	4.0	2.0	10.0	84.0	Expérience X — Le 4/v à 10 h. matin, dans le sang de cobaye pleine 8,350 leuc. Inj. sous-cutanée de 1/3 de c. c. de culture en bouillon de bacille pyocyanique. A 12 h. 55 3,334 leuc. par mil. c. de sang.
N° 7. { Long. 12 c. Poids 39 gr. 2.	6.010.000	423	641	62	0	24	535	9.6	0	3.8	86.5	Immédiatement l'opération césarienne et l'examen du sang fœtal.
N° 8. { Long. 12 c. Poids 41 gr. 5.	6.044.000	95	1.433	109	13	40	1.271	7.6	0.9	2.8	88.7	

* Il a été impossible de préciser le nombre de leucocytes de chaque variété dans ce cas, car on n'a pu compter que trop peu de leucocytes sur des préparations desséchées.

Le fœtus n° 1 provient de la 4^{re} cobaye, les nos 2 et 3 proviennent de la 2^e, les nos 4 et 5 de la 3^e et les nos 6, 7, 8 de la 4^e.

SUR L'IMMUNITÉ DES PIGEONS ET DES COBAYES

VACCINÉS CONTRE LE CHARBON

ET SUR LES PROPRIÉTÉS DE LEUR SÉRUM

PAR JACQUES DE NITTIS

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Sous l'inspiration de M. Metchnikoff, nous avons vacciné contre le charbon, d'une part, des pigeons — espèce réfractaire que la bactériémie tue difficilement — et, d'autre part, des cobayes, animaux si réceptifs que les auteurs considèrent leur vaccination comme impossible.

Ces animaux étant vaccinés solidement, nous leur avons pris du sérum pour en étudier les propriétés spécifiques.

*
* *

Vaccination du pigeon.

La vaccination du pigeon ne présente pas de difficultés, vu l'immunité naturelle. Toutefois, cette vaccination est réelle, c'est-à-dire qu'un pigeon vacciné survit à l'injection d'une dose de culture charbonneuse mortelle pour le témoin.

Nous avons commencé la vaccination par le premier ou le deuxième vaccin de Pasteur.

Un animal vacciné brutalement par de seules injections virulentes nous a fourni, peut-être par hasard, un sérum peu actif; mais, ayant surtout en vue de maintenir la similitude entre la vaccination de certains de nos pigeons et de certains de nos cobayes, les inoculations de bactériémies atténuées s'imposaient pour les animaux de l'espèce réfractaire, puisque ces inoculations étaient indispensables à l'immunisation des cobayes.

Les pigeons jeunes maigrissent notablement sous l'influence

du deuxième vaccin de Pasteur. Nos injections étaient pratiquées sous la peau ; les dernières seules étaient intra-musculaires. En général, l'œdème, au cours de l'immunisation, était imperceptible et il était à peu près impossible de retirer des bactériidies vivantes plus de 24 ou 30 heures après l'injection sous-cutanée.

Vaccination du cobaye.

La vaccination du cobaye est une opération longue et délicate ; avec la méthode des vaccins atténués, on n'obtient le résultat cherché qu'après 2 mois au moins ou 3 mois ; peut-être même, malgré toutes les précautions, est-il inévitable de perdre quelques animaux.

La difficulté est de passer d'un vaccin à l'autre, et surtout du deuxième vaccin au charbon virulent. Aussi, avons-nous entre-tenu des cultures de deuxième vaccin ayant subi 1 ou 2 passages ; cet échantillon possède la virulence exactement nécessaire pour tuer les cobayes neufs à dose infinitésimale : il nous a donc été précieux non seulement pour les vaccinations, mais pour certaines recherches d'atténuation.

Une bonne vaccination doit se faire sans déterminer de gros œdèmes ; le poids et la température peuvent varier notablement.

Une diminution brusque du poids en 4 ou 5 jours a généralement précédé la mort par broncho-pneumonie charbonneuse, (nous avons vu le fait se produire dès les injections du deuxième vaccin). Dans ces cas malheureux, le cobaye meurt avec un écoulement de sang par les narines, le poumon est congestionné totalement et atélectasique ; dans l'infarctus hémorragique de la plèvre (parfois accompagné de péricardite), on trouve de nombreuses bactériidies et des cellules éosinophiles.

Après chaque injection nouvelle, au cours de la vaccination, il doit se faire une phagocytose active : au bout de 24 heures, on doit retirer avec peine une petite quantité d'exsudat sanguinolent, où l'on trouve de très nombreux polynucléaires, et où ne subsistent que de rares bactériidies vivantes. Au bout de 48 heures, si l'on enfonce une pipette à travers l'orifice même de l'injection, on ne doit plus trouver de bactériidies, ni à l'examen microscopique ni par les cultures.

La vaccination d'un cobaye, prudemment conduite, dure deux mois au minimum ; nous avons généralement vu s'écouler

trois mois jusqu'au moment où l'animal supportait de fortes doses de charbon virulent.

La vaccination doit être commencée prudemment : deux cobayes ayant déjà supporté $1/10$ puis $1/3$ de c. c. de premier vaccin (en culture de 24 heures), sont inoculés le 2 mars avec $1/2$ c. c. de premier vaccin de Pasteur (en culture), en même temps qu'un cobaye neuf; les deux vaccinés se comportent de la façon ci-dessus décrite, tandis que l'animal neuf meurt en 4 jours avec un gros œdème.

Il ne sert à rien de vouloir sauter les étapes intermédiaires : le 15 mars un cobaye neuf, exceptionnellement résistant, reçoit $1/2$ c. c. de deuxième vaccin; il a un œdème énorme qui s'ulcère; finalement l'animal se rétablit, mais au bout de deux semaines il meurt d'une nouvelle injection que supportent sans dommage les cobayes lentement amenés à supporter $1/2$ c. c. de deuxième vaccin.

Après chaque injection, la température baisse légèrement avec le poids, puis remonte.

Nous avons aussi vacciné quelques cobayes avec des cultures asporogènes; c'est surtout le début de l'immunisation qui se trouve ainsi simplifié; mais la difficulté d'obtention et d'entretien d'échantillons à virulence déterminée nous ont engagé à recourir plutôt au charbon ordinaire. Du reste, les cultures de vaccin et de bactéridie ne commencent à sporuler, en bouillon, qu'après 48 heures.

Quant à l'immunité finalement atteinte, elle est considérable.

Le résultat paradoxal obtenu avec le sérum nous engageait à pousser la vaccination aussi loin que possible.

Un de nos cobayes a supporté la dose considérable de $1/2$ c. c. d'une culture de 48 heures d'une bactéridie recueillie à l'autopsie d'un mouton charbonneux. Deux jours après, on ne retrouvait plus de bactéridies au point d'inoculation; tandis que le témoin, plus lourd, était mort en 30 heures à peu près.

En général nos cobayes supportaient finalement de 5 à 10 gouttes de culture virulente en bouillon.

Exemples de vaccination de cobayes :

Février.	<i>Cobaye marqué d'une tache rouge sur le dos.</i>		<i>Cobaye marqué d'une croix bleue sur le dos. (Fin de la vaccination.)</i>
22	595 ^{sr} , 36°5, reçoit 2 gouttes premier vaccin.	15 avril.	925 ^{sr} , 1/8 c. c. charbon vir.
23	580 ^{sr} , 36°, 7 petit œdème.	17	880 ^{sr} .
24	600 ^{sr} , 37°, 2 id.	27	920 ^{sr} , 1/4 c. c. charbon vir.
27	600 ^{sr} , 1/3 c. c. 1 ^{er} vaccin.	29	900 ^{sr} .
28	590 ^{sr} , 36°, 7.	5 mai.	900 ^{sr} , 1/3 c. c. charbon vir.
2 mars.	605 ^{sr} , 0,5 c. c. 1 ^{er} vaccin.	15	940 ^{sr} , 1/2 c. c. charbon vir.
10	650 ^{sr} , 1/5 c. c. 2 ^e vaccin.	8 juin.	2/3 c. c. charbon vir.
15	630 ^{sr} , 36°, 4. 0,4 c. c. 2 ^e v.	20	910 ^{sr} , 1 c. c. charbon vir.
17	680 ^{sr} , 36°, 7.	24	835 ^{sr} .
20	670 ^{sr} , 0,7 c. c. 2 ^e vaccin.	5 juillet.	Un peu de culture charbonneuse provenant d'un jeune pigeon.
22	680 ^{sr} , un peu d'œdème 28°, 7.	22	Saignée.
24	670 ^{sr} , idem, 37°, 9.		
25	690 ^{sr} .		
28	695 ^{sr} , 37°, 8, 1 c. c. 2 ^e v.		
1 ^{er} avril.	675 ^{sr} , 38°.		
6	1/5 c. c. 2 ^e vaccin.		
15	633 ^{sr} , 1/4 c. c. de 2 ^e vac. Ayant passé par l'animal.		
25	705 ^{sr} , 1/5 c. c. charbon virulent.		
26	690 ^{sr} .		
27	700 ^{sr} .		
2 mai.	720 ^{sr} , 8 gouttes charb. vir.		
15	Saignée.		

Quand nous avons ainsi disposé d'animaux vaccinés, nous avons cherché ce que devenait la virulence des bactériidies injectées, et nous avons expérimenté les propriétés du sérum.

II

RECHERCHES SUR L'IMMUNITÉ DES PIGEONS VACCINÉS ET SUR LES PROPRIÉTÉS DE LEUR SÉRUM

A. — Pour savoir ce que devenait la virulence des bactériidies injectées aux pigeons vaccinés, nous avons injecté la même dose de culture à un pigeon neuf d'une part, à un pigeon vacciné de l'autre, puis, au bout de 9, 15 ou 24 heures, nous avons repris avec une pipette un peu de liquide à chacun des pigeons, et en avons injecté respectivement à deux séries d'animaux sensibles.

Expérience I. — Le 5 avril 1900, vers 8 heures, nous injectons 1 c. c. de culture virulente (en bouillon, 20 heures d'étuve, puis bien émulsionnée) à un pigeon vacciné et à un pigeon neuf.

La bactériдие est reprise le soir même vers 5 heures au point d'inoculation et injectée à deux souris, après vérification de la présence de la bactériдие.

Liquide retiré du pigeon (aile gauche marquée de rouge) vacciné.

Injecté le 5 au soir à une souris marquée de rouge.

Liquide retiré du pigeon (aile gauche marquée de bleu) neuf.

Injecté le 5 au soir à une souris marquée de bleu.

Les deux souris sont trouvées mortes le 7 au matin.

Expérience II. — 6 novembre 1899.

Pigeon vacciné (émulsion de 1/6 de culture de 24 heures sur gélose.)

Le 7 (15 heures après), l'exsudat retiré est injecté à un cobaye et à une souris marquée de rouge.

La souris est trouvée morte le 8, après midi.

Le cobaye meurt dans la matinée du 9 (en 48 heures).

Pigeon vacciné neuf (émulsion de 1/6 de culture de 24 heures sur gélose.)

Le 7 (15 heures après), l'exsudat retiré est injecté à un cobaye et à une souris marquée de bleu.

La souris meurt le 8, vers 5 heures (en 32 heures).

Le cobaye est trouvé mort le 9 au matin.

L'autopsie a montré les bactériidies dans le sang; de plus, l'œdème au point d'inoculation des animaux de la *série rouge* ne présentait que la phagocytose insuffisante et tardive qu'on ne peut confondre avec celle qui survient chez les animaux traités par le sérum de pigeon vacciné: ce qui prouve que la petite quantité d'humeurs de pigeon vacciné n'avait pas exercé d'influence notable sur le résultat.

Nous avons souvent échoué lorsque nous avons tenté de puiser du liquide chez le pigeon, 24 heures après l'inoculation: nous n'avons pas pu retrouver de bactériidies.

Il en a été de même quand nous avons essayé de reproduire l'expérience précédente avec des échantillons atténués de bactériidies. Avant d'injecter aux animaux réactifs l'exsudat retiré des pigeons, nous faisons une préparation avec la dilution de cet exsudat dans l'eau salée à 7 0/00, et nous injectons de ces dilutions des volumes inversement proportionnels à la richesse approximativement constatée.

Jamais nous n'avons pu constater, quelque minime que fût la dose injectée aux animaux réactifs, une atténuation quelconque du charbon injecté aux pigeons vaccinés; nous ne pouvons dire non plus si la bactériдие s'est exaltée davantage dans l'organisme des pigeons vaccinés: les essais devaient être pratiqués avec du charbon virulent et nous ne pouvions, chez le pigeon, avoir recours à l'artifice employé pour le cobaye.

La seule certitude est que, à dose minime, la bactériдие passée par le pigeon vacciné tuait les souris et les cobayes aussi vite que la bactériдие provenant d'un pigeon neuf.

B. — Nous avons cultivé la bactériodie comparativement dans le sérum des pigeons vaccinés et dans le sérum des pigeons neufs; les deux cultures ainsi obtenues étaient ensuite lavées sur un filtre de papier buvard spécial, puis les bactériodies restées sur le filtre étaient émulsionnées, et les émulsions ainsi obtenues injectées à deux animaux, en quantité inversement proportionnelle à leur richesse.

Les premiers essais n'ont pas donné de résultat bien net : les cultures de bactériodie en immun-sérum et en normal-sérum de pigeon, après 24 heures de culture, tuaient à peu près dans les mêmes délais; ou du moins la survie ne dépassait guère les hasards possibles.

Nous avons uniquement pour but de comparer la virulence de ces cultures en sérum; aussi, habituellement, ne faisons-nous même pas la comparaison avec une culture contemporaine en bouillon. Deux expériences préalables nous avaient appris que le sérum de pigeon normal est très légèrement bactéricide, sans jamais déterminer dans les cultures la mort ni la déformation des bactériodies, qui prenaient bien la couleur.

Les cultures faites en sérum normal et en immun-sérum de pigeon présentent de légères différences morphologiques.

La culture en normal-sérum est louche, composée de petits bacilles grêles en chaînes assez longues parfois; en immun-sérum, la culture, limpide avec un dépôt, montrait au microscope des bactériodies un peu plus épaisses. Les spores apparaissent plus tardivement que dans le bouillon, et en premier lieu dans le normal-sérum.

Abandonnées une vingtaine de jours à la température ordinaire, puis chauffées à 72° pendant 10 minutes dans des tubes capillaires, les culturesensemencées se développent : celle qui provient de normal-sérum donne de petits bacilles rectilignes, celle de l'immun-sérum des chaînettes courbes de plusieurs bacilles (cette forme correspondrait assez exactement aux résultats obtenus quant à l'atténuation).

Quant à l'agglutination, déjà étudiée par d'autres, nous l'avons examinée en gouttes pendantes sur des émulsions de premier vaccin (le charbon virulent ne pouvant être émulsionné).

Le sérum de pigeon normal dépourvu de tout élément cellulaire n'agglutine pas.

Le sérum de pigeon vacciné agglutine en 10 minutes, à la proportion de 1 pour 50 d'émulsion (on pourrait sans doute suivre le phénomène plus loin, mais il faut, pour la bactériodie, se défier des mesures précises en matières d'agglutination).

L'action du sérum de pigeon vacciné par rapport à celle du sérum de pigeon normal n'étant pas apparue dans les conditions des expériences précitées, nous avons voulu prolonger le temps de contact et opérer avec des échantillons moins virulents.

Nous avons ensemencé 1 goutte de sang charbonneux (c'est-à-dire dépourvu de spores) simultanément dans un petit tube d'immun-sérum de pigeon et dans un tube de sérum de pigeon neuf; les deux cultures étaient ensuite faites à 42° pour éviter la formation des spores, sur lesquelles il était permis de supposer que le sérum n'eût pas exercé d'action.

Si on laisse les cultures (ensemencées d'un échantillon de bactériodie dont 1 anse tue un cobaye moyen en 36 heures) à 42° pendant 3 jours, on les amène à la limite où leur injection tue le cobaye à petite dose, c'est-à-dire que la moindre cause d'atténuation surajoutée enlève toute virulence.

Dans l'espèce, les cultures en sérum normal, après lavage, tuent encore le cobaye, tandis que les cultures en sérum spécifique ne le tuent plus.

Expérience I. — Les cultures en sérum spécifique et en sérum normal avaient été ensemencées le 21 février avec le sang d'un cobaye mort du charbon (voir *Expérience IV* avec le sérum de pigeon), puis laissées à 42° jusqu'au 26, et ensuite abandonnées à la température du laboratoire, enfin lavées sur buvard. Les émulsions grossièrement numérotées au microscope sont injectées en raison inverse de leur richesse.

1 ^{er} mai 1900.	Cobaye marqué de rouge, émulsion de bactériodies provenant du sérum de pigeon vacciné.	Cobaye marqué de bleu, émulsion de bactériodies provenant du sérum de pigeon vacciné normal.
4 mai.	Survit indéfiniment.	Trouvé mort le dimanche matin, 4 mai. Autopsie typique.

Expérience II. — 15 mars 1900. Cultures en sérum laissées à 42° depuis le 12. De 10 heures du matin à 4 heures du soir, le 15, ces cultures sont déposées dans un filtre de porcelaine mince, stérilisé, et qui baigne dans un courant d'eau salée à

7 0/00 dont le niveau est maintenu un peu plus élevé que celui des cultures dans le filtre.

15	Souris marquée de rouge, reçoit 1/3 de goutte de culture en immun-sérum de pigeon.	Souris marquée de bleu, reçoit 1/2 goutte (émulsion moins riche) normal-sérum de pigeon.
17	Survit indéfiniment.	Trouvée morte le 17 au matin. Autopsie typique.

Expérience III. — Un nouvel essai, sur 2 cobayes, a donné une survie de 40 à 45 heures pour l'animal inoculé de la culture en sérum normal, et de 70 à 80 heures pour l'animal inoculé avec les bactériidies de l'immun-sérum.

Expérience IV. — Une expérience a été nulle en ce que les deux souris sont mortes en 30 heures. (Celle qui avait reçu la culture en immun-sérum serait même morte avant l'autre.)

Expérience V. — Plutôt que d'atténuer la bactériidie par un séjour à 42°, nous avons voulu opérer sur un animal moins sensible au charbon, sur le lapin.

Des culturesensemencées le 14 sont laissées 2 jours à l'étuve à 36°, lavées le 16 et injectées. (1/2 c. c. de culture en sérum est étendu de 3 c. c. d'eau, et nous injectons 1/2 c. c. de cette dilution, soit 1/14 de c. c. de la culture.)

16 février 1900.	Lapin gris, 1,800 ^{gr} , reçoit la culture de l'immun-sérum.	Lapin gris, collier blanc, 2,000 ^{gr} , reçoit la culture du normal-sérum.
17		Meurt du charbon, le soir,
18	Meurt dans la journée (de 48 à 55 heures) du charbon.	(36 heures).

Expérience VI. — Mais un des essais a été pratiqué avec le sérum d'un pigeon préparé d'une façon spéciale; ce pigeon avait reçu pour la première fois, 7 ou 8 jours auparavant,

1. Nous avons essayé ce dispositif pour que la culture se trouve lavée sans l'obligation de recueillir les bactériidies avec un pinceau sur un filtre qui lui abandonne toujours des fragments de papier; de plus, ce dispositif nous paraissait exposer à moins de chances de contamination. Le liquide lavé (nous avons choisi exprès un sérum un peu chargé d'hémoglobine pour nous fixer sur la valeur du procédé) était encore vaguement rouge, et l'on voyait au microscope des globules rouges, un peu crénelés. On peut penser que le lavage, dans ces conditions, a été insuffisant, mais la dose injectée aux animaux était si faible que cette insuffisance de lavage ne pouvait influencer le résultat. En effet, le sérum spécifique du pigeon n'agit qu'à la dose minima de 5 gouttes; les essais pratiqués avec 1 ou 2 gouttes n'ont jamais sauvé les souris. Or, dans l'expérience que nous décrivons, nous n'avons injecté qu'un tiers de goutte, en sorte que la quantité de sérum introduite était négligeable même dans l'hypothèse d'un lavage nul des cultures.

une dose massive de culture charbonneuse; le sérum que nous lui avons pris n'avait pu, à la dose de 1 c. c., protéger une souris blanche contre la mort par le deuxième vaccin ayant subi deux passages. Ce sérum était donc inactif au point de vue de l'immunité, et pourtant il a nettement atténué la bactériémie que nous y avons cultivée.

Le 29 mars 1900, la bactériémie virulente et sans spores a été ensemencée simultanément dans un tube de sérum de pigeon neuf et dans un tube de sérum du pigeon dont nous venons de parler. Le 2 avril, ont eu lieu les inoculations.

2 avril.	Cobaye marqué de jaune, reçoit une petite quantité de culture lavée du sérum de pigeon normal.	Cobaye marqué d'éosine, reçoit une petite quantité de culture lavée du sérum de pigeon préparé.
5	Survit indéfiniment.	Trouvé mort le 5. Autop. typique.

Il semblerait donc que le pouvoir atténuant, au moins pour ce qui concerne le charbon, dépend plus de la race des animaux sérumifères que de leur immunité.

C. — Sérum de pigeon vacciné. — Le 17 juillet 1899, à un pigeon vacciné (inoculé pour la dernière fois le 30 juin), nous avons pris du sang en même temps qu'à un pigeon neuf.

Le 18 juillet, nous avons injecté 3 souris avec une émulsion de deuxième vaccin ayant subi 2 passages; chacune reçoit 1/4 d'anse; en outre la souris marquée de bleu reçoit 1/2 c. c. de sérum de pigeon vacciné, la souris sans marque reçoit la même quantité de sérum de pigeon normal.

Les résultats sont contenus dans le tableau suivant :

Expérience I. — Virus et culture injectés en des endroits éloignés, mais en même temps.

17 juillet.	Souris tache bleue Virus. + 1/2 c. c. immun- sérum de pigeon.	Souris sans marque Virus. + 1/2 c. c. normal- sérum.	Souris tache rouge Virus seul.
19	Survit indéfiniment.	Morte en 24 heures, bactériémie.	Morte en 24 heures, bactériémie.

Expérience II. — 30 août 1899. Sérum et culture injectés en des points éloignés à peu de temps d'intervalle.

	Souris tache rouge.	Souris tache bleue.
30 août.	12 gouttes d'immun-sérum pigeon + émulsion de bactériidies.	12 gouttes normal-sérum pigeon + émulsion de bactériidies.
31	Survit indéfiniment.	Morte en 26 heures. Autopsie typique.

Expérience III. — 5 gouttes de cultures charbonneuses de 42 heures sont diluées dans 5 c. c. de bouillon.

D'autre part, dans deux verres stériles sont versés 5 c. c. de sérum normal et 5 c. c. de sérum spécifique. Chacun de ces verres reçoit en outre 5 c. c. de l'émulsion de bactériidies.

30 octobre.	Cobaye tache rouge, 360 ^{sr} , sérum normal et bactériidies.	Cobaye tache bleue, 400 ^{sr} , bactériidies seulement.	Cobaye sans marque, 370 ^{sr} , immun-sérum et bactériidies.
1 ^{er} novembre.	Mort dans la journée du charbon.	Mort dans la journée du charbon.	Survit indéfiniment.

Expérience IV. — Une expérience du 28 juillet 1899 a donné un résultat nul. Le cobaye témoin aussi bien que les animaux inoculés de normal et d'immun-sérum ont été trouvés morts au bout de 40 heures. La quantité de culture charbonneuse (1/2 c. c.) était trop forte.

Expérience V. — Le 19 février 1900, 2 cobayes sont inoculés de 1/3 de goutte d'une culture de 40 heures de charbon virulent, et, à une autre partie du corps, de sérum de pigeon.

19 février.	Cobaye roux, marqué d'un numéro à l'oreille, 430 ^{sr} . Sérum, pigeon neuf.	Cobaye marqué d'une tache d'éosine, 400 ^{sr} . Sérum pigeon vacciné.
20	385 ^{sr} , œdème.	390 ^{sr} .
21	Mort. Autopsie typique.	
1 ^{er} mars.		Vivant.

Le sérum de pigeon est donc réellement efficace pour protéger les cobayes et les souris contre la dose mortelle de virus charbonneux, à condition que cette dose ne soit pas trop grande.

Or, au moyen des autres espèces animales, on n'avait guère obtenu de sérum spécifique capable de protéger les souris ni les cobayes. Les résultats positifs de Marchoux et de Sclavo ont été contredits par Sobernheim qui, de son côté, n'a pas réussi davan-

tage à obtenir un sérum capable d'entraver l'infection des souris ni des cobayes.

Ce dernier auteur n'a pas vu la phagocytose s'accroître chez les lapins inoculés de virus charbonneux et traités par le sérum spécifique de moutons vaccinés. La phagocytose était au contraire frappante chez les cobayes : si dans l'œdème prélevé 24 heures après l'inoculation, on trouve des bactériidies abondantes et peu de phagocytes, les animaux succomberont par la suite. Dans le même délai, au contraire, chez les cobayes traités, on voit de nombreux polynucléaires dans le liquide au point d'inoculation où aucun œdème n'est visible ; quant aux mononucléaires, ils n'apparaissent que plus tard, après la disparition des bactériidies dont un certain nombre disparaît par mécanisme extra-cellulaire.

Nous avons voulu vérifier que le sérum de pigeon vacciné protège les animaux de même espèce. Nous nous sommes servi d'un échantillon spécialement exalté pour le pigeon, très virulent également pour le cobaye.

Deux pigeons ont reçu, le 3 avril 1900, des mélanges de sérum et de 1/4 de c. c. culture charbonneuse.

3 avril.	Pigeon tête blanche.	Pigeon tête grise.
	4 c. c. normal-sérum de pigeon. + 1/4 c. c. culture charbon.	4 c. c. immun-sérum de pigeon, + 1/4 culture charbon.
8	Mort du charbon.	Survit indéfiniment.

III

IMMUNITÉ DU COBAYE

A. — *Virulence des bactériidies injectées sous la peau des cobayes neufs et des cobayes vaccinés.* — Nous avons employé la méthode qui consiste à injecter une certaine quantité de bactériidies sans spores simultanément sous la peau d'un cobaye neuf et d'un cobaye vacciné. Le lendemain, si on a employé des doses convenables, on peut recueillir une certaine quantité d'exsudat au moyen d'une pipette fine introduite à travers le pertuis créé la veille par l'aiguille.

Pour que l'expérience réussisse, la dose de bactériidies varie avec l'immunisation du cobaye. Nous trouvons une grande commodité à nous servir de cobayes moyennement immunisés, c'est-à-dire ayant bien supporté 1 ou 2 gouttes de culture

virulente, et à injecter à ces cobayes, en même temps qu'aux animaux neufs, 1/2 c. c. de culture de 24 heures de deuxième vaccin, exalté par 1 ou 2 passages.

Si, en effet, le cobaye vacciné est trop fortement immunisé ou si la dose de charbon injectée est trop faible, on ne pourra recueillir de bactériidies le lendemain. (C'est ce qui a entravé nos premiers essais.)

Nous avons déjà dit que l'œdème des cobayes vaccinés, inoculés par une dose voisine de la dose maxima qu'ils peuvent supporter, ne contient plus de bactériidies au bout de 40 à 48 heures; ce délai est abrégé pour les quantités plus faibles et pour les virus atténués. D'autre part, chaque fois que nous avons trouvé des bactériidies au point d'inoculation après 48 heures, le cobaye a succombé.

Dans l'expérience telle que nous l'avons réglée, on peut retirer au bout de 24 heures de l'œdème du cobaye neuf un liquide clair, riche en bactériidies libres, et ne contenant que très peu de leucocytes; le cobaye vacciné fournit avec peine une petite quantité d'un liquide sanguinolent où les bactériidies sont rares, mais souvent libres, et qui renferme de très nombreux polynucléaires et peu ou pas de mononucléaires.

Ces liquides sont immédiatement dilués dans l'eau salée à 7 0/00, afin d'éviter la complication de les voir coaguler dans les pipettes. Les dilutions obtenues sont examinées au microscope dans le but d'établir une numération approximative,ensemencées pour acquérir la certitude que les bactériidies sont vivantes, et enfin injectées aux animaux réactifs en quantité inversement proportionnelle à leur richesse en bactériidies.

Nous verrons qu'il n'y a pas lieu de tenir compte de la petite quantité d'humeurs du vacciné introduite.

Après 3 expériences qui ont échoué pour les raisons données plus haut, nous avons obtenu les résultats suivants :

Expérience I. — Le 15 mai nous avons inoculé simultanément l'exsudat d'un cobaye.

13 mai.	Vacciné, inoculé la veille de 1/2 c. c. de 2 ^e vaccin, deux passages, à une souris marquée de bleu.	Neuf, inoculé la veille de 1/2 c. c. de 2 ^e vaccin deux passages, à une souris marquée de rouge.
16		Morte le 16 (25 ou 30 heures), du charbon.
17	Morte le 17 (36 à 42 heures), du charbon.	

Les doses étaient un peu fortes pour la souris.

Expérience II. — Le 13 juin.

Les bactéries, provenant d'un cobaye vacciné, inoculé la veille de vaccin II, 1 passage, sont injectées à un cobaye	une souris marquée de bleu.	Les bactériidies provenant d'un cobaye neuf, inoculé la veille de vaccin II, 1 passage sont injectées à un cobaye	une souris marquée de rouge.
	Meurt le 17 (a dévoré la souris rouge) du charbon.	Meurt le 15 au soir, du charbon.	Meurt le 15. Autopsie impossible.
Survit indéfiniment.			

La bactériidie, reprise dans l'œdème du cobaye vacciné, était vivante, puisqu'elle a tué la souris bleue.

Expérience III. — 1^{er} juillet 1900.

Cobaye marqué de bleu, reçoit les bactériidies d'un cobaye vacciné.	Cobaye marqué de rouge, reçoit les bactériidies d'un cobaye neuf.
Survit indéfiniment.	Meurt le 3 juillet.

Les cobayes neufs auxquels les bactériidies étaient prises sont toujours morts en 2 ou 3 jours.

Les cobayes vaccinés différents ont été utilisés pour ces expériences. Il semble donc bien que la bactériidie se trouve atténuée dans l'organisme des cobayes vaccinés.

Cette atténuation paraît au premier abord considérable; mais il faut se rendre compte que la netteté des 3 expériences ci-dessus résulte d'un artifice et que le deuxième vaccin ayant subi un passage constitue le virus limite, pour ainsi dire, qui tue sûrement les cobayes à dose infime.

B. — Culture de la bactériidie dans le sérum de cobaye vacciné et dans le sérum de cobaye neuf. Les cultures de bactériidie (deuxième vaccin ayant subi 1 ou 2 passages) dans chacun de

ces sérums, ne présentent guère de différences après 24 heures à 36°, que les espaces clairs et la répartition en petits amas des filaments de l'immun-sérum, qui contiennent des spores au bout de 72 heures; dans le sérum normal, en revanche, nous avons remarqué quelques spores grosses qui donnaient à la bactériodie l'apparence d'un fuseau.

Les cultures de l'immun-sérum étaient au bout de 24 heures limpides avec un dépôt au fond du tube, tandis que celle du normal-sérum présentait un louche uniforme.

Ce résultat est contraire à ce qui est connu de l'agglutination qui est causée même par le sérum de cobaye normal. Le sérum spécifique agglutine davantage, en proportion très variable : en gouttes pendantes, on constate en un quart d'heure une agglutination au 1/500 quelquefois, et au moins à 1,200.

Pour apprécier la virulence des bactériodies cultivées dans le sérum normal et de celles du sérum spécifique de cobayes, nous les avons injectées à des cobayes.

Expérience I. — Culture du 9 mai 1899, injectée le 11, à des souris (premier vaccin).

11 mai.	Culture du sérum de cobaye vacciné. 4 gouttes.	Culture du sérum de cobaye normal. 4 gouttes.	4 gouttes culture en bouillon, + 4 gout- tes sérum de cobaye vacciné.
	Souris marquée de bleu.	Souris marquée de rouge.	Souris marquée de bleu et rouge.
13 mai.	Morte du charbon.	Survit indéfiniment.	Morte du charbon.

Cette expérience date d'une époque où nous ne connaissons pas encore les propriétés du sérum de cobaye vacciné au point de vue de l'immunité; les 4 gouttes de sérum de cobaye vacciné avaient pour but de compenser la quantité de sérum de cobaye vacciné données à la souris marquée de bleu.

Expérience II. — Avec du deuxième vaccin, 1 passage, en cultures dans le sérum, datant de 46 heures.

21 juillet.	Cobaye tête jaune, culture en normal-sérum de cobaye. 495 ^{es} .	Cobaye tête noire, culture en normal sérum de cobaye. 500 ^{es} .
23	Meurt vers 4 heures, du charbon.	Survit jusqu'au 25.

Expérience III. — Avec les mêmes cultures abandonnées à la température ordinaire, nous injectons 2 nouveaux cobayes le 26 juillet, en même temps que 2 souris. Les deux souris sur vivent indéfiniment; les 2 cobayes meurent à 15 heures d'inter

valle l'un de l'autre, celui qui a reçu les bactériidies de l'immun-sérum le premier, du 31 juillet au 1^{er} août.

Peut-être pourrait-on admettre que les substances atténuantes du sérum spécifique ont été détruites dans l'intervalle du 21 ou 26 juillet, ce qui correspondrait à ce fait que les vieilles cultures dans l'un et l'autre sérum ne présentent plus de différences morphologiques, et que les bacilles s'y montrent bien colorés, mais un peu gonflés, comme boursoufflés par places.

Une quatrième expérience avec cultures de 3 jours nous a donné un résultat analogue à celui de l'*Expérience II*.

En somme, peut-être y a-t-il chez certains cobayes vaccinés des substances atténuantes dans le sérum, mais l'effet en serait bien fugace ; nos expériences ne permettent pas de conclure que les bactériidies cultivées dans l'immun-sérum subissent d'atténuation.

C. — *Sérum des cobayes vaccinés*. Nous avons tenté sans succès la sérothérapie des cobayes et des souris au moyen du sérum de cobayes vaccinés ; nous avons essayé d'empêcher ou de retarder l'infection causée par les vaccins au moyen de sérum pris à des cobayes vaccinés contre la bactériдие virulente, sans y réussir davantage.

Expérience I. — 9 mai 1899.

Souris blanche, charbon seulement.

Souris blanche marquée de jaune, charbon.
+ 0^{cc}.8 sérum de cobaye vacciné (injectés loin l'un de l'autre).

Mortes toutes les deux le 11 au matin, du charbon.

Expérience II. — 27 avril 1899. Deux souris tache rouge pour le sérum et le deuxième vaccin, 2 souris marquées de bleu comme témoins. L'une des bleues meurt la première de la série, l'autre bleue en revanche survit aux autres.

Expérience III. — Nouvel essai le 3 mai avec deux souris. Celle qui reçoit, outre la bactériдие virulente, 13 gouttes de sérum de cobaye vacciné meurt la première. Autopsie montrant les bactériidies dans le sang.

Expérience IV. — Essai pratiqué le 28 juillet 1899, sur une série de 5 cobayes dont chacun avait reçu une forte dose de bactériidies. L'un des cobayes avait reçu en outre 2 c. c. de sérum de cobaye normal, un autre, 2 c. c. de sérum de cobaye vacciné, un troisième, 2 c. c. de sérum ce pigeon normal ; le

dernier, 2 c. c. de sérum de pigeon vacciné. La dose de sérum était un peu faible, la quantité de bactériidies considérable. Le cobaye qui avait reçu le sérum de cobaye vacciné survécut de 1 jour à tous les autres, qui moururent pêle-mêle en 40 ou 45 heures; résultat en contradiction avec toutes les autres expériences. (C'est l'essai dont il est parlé d'autre part (voir *Expérience IV*) avec le sérum de pigeon.)

Expérience V. — Sur des cobayes, avec 1 goutte de deuxième vaccin ayant subi 1 passage, 4 juin 1900. 4 c. c. de sérum spécifique n'empêchent pas le cobaye traité de mourir avec l'autre dans la journée du 6.

Expérience VI. — Le 2 août 1899, avec le même sérum de cobaye qui avait semblé protéger le cobaye de l'expérience IV, nous injectons une souris, tandis qu'un témoin reçoit du sérum de normal. La dose considérable de 1 c. c. de sérum n'empêche pas que, dans la journée du 5, les deux souris ne meurent : le 6 au matin, je constate que la souris à l'immun-sérum a été dévorée par l'autre.

En somme, nous pouvons affirmer que le sérum de cobaye solidement vacciné contre le charbon ne jouit d'aucune propriété immunisante, non seulement à l'égard de la bactériдие virulente, mais encore à l'égard de l'un des virus atténués ayant servi à l'immunisation.

CONCLUSIONS. I. On peut vacciner facilement contre le charbon le pigeon et difficilement le cobaye par la méthode des vaccins charbonneux.

II. A. — Les bactériidies introduites sous la peau des pigeons vaccinés conservent leur virulence.

B. — La virulence de la bactériдие cultivée en immun-sérum de pigeon diminue.

C. — Le sérum de pigeon vacciné protège bien les cobayes et les souris contre la mort par le charbon.

III. A. — Les bactériidies introduites sous la peau des cobayes vaccinés s'y atténuent.

B. — Cultivées dans le sérum de cobaye vacciné, elles semblent y conserver leur virulence.

C. — Le sérum de cobaye fortement vacciné est sans action sur l'infection des souris et des cobayes inoculés de charbon.

Les Antihémolysines naturelles

PAR LE D^r BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Les lecteurs de ces *Annales* sont suffisamment familiarisés avec le terme *cytotoxine*, introduit dans la science par M. Metchnikoff, pour que nous nous dispensions d'entrer dans de longs détails sur ce point. Ce sont des toxines cellulaires, incorporées dans les sérums des animaux ayant reçu en injection des cellules d'une espèce animale étrangère.

La nature chimique de ces toxines est très peu connue. Ce qui les caractérise avant tout, c'est leur spécificité qui porte non seulement sur la nature de la cellule, mais encore sur l'espèce animale à laquelle cette cellule appartient.

Ainsi, par exemple, une cytotoxine active pour les globules rouges de lapin est sans action non seulement sur les cellules rénales ou hépatiques, mais elle est aussi inactive vis-à-vis des globules rouges autres que ceux de lapin. En d'autres termes, à chaque groupe cellulaire d'une espèce animale donnée correspond une cytotoxine spéciale ou spécifique.

Cette cytotoxine, dirigée contre une catégorie déterminée de cellules, est-elle unique dans la nature, ou bien en existe-t-il un certain nombre, et cela selon l'espèce animale qui est chargée d'en fabriquer?

Prenons un exemple concret pour mieux fixer les idées. Nous savons qu'en injectant à un cobaye des globules rouges de mouton, on obtient une hémotoxine qui dissout les globules rouges de mouton; on peut obtenir également une hémotoxine active pour le mouton, en injectant du sang défibriné de ce dernier à un autre animal, à un lapin, par exemple. Or, on peut se demander si ces deux hémotoxines, actives pour la même espèce de globules, mais fournies par deux espèces animales différentes, ne font qu'un, ou bien si ce sont deux substances différentes.

Ce problème, à notre connaissance, n'a pas été étudié. *A priori*, tout porte à croire qu'il s'agit de la même toxine, les propriétés de celle-ci devant être régies, à l'exemple des sérums anti-microbiens, par la nature des cellules injectées et non pas par celle de l'animal que l'on injecte. Des expériences qui vont être résumées plus loin, il résulte en effet que les cytotoxines en question, provenant de différents animaux, sont identiques pour ce qui concerne leur partie essentielle, l'anticorps spécifique que nous appelons avec M. Metchnikoff, *substance fixatrice* ou *fixateur*, que M. Bordet appelle *substance sensibilisatrice*, et que MM. Ehrlich et Morgenroth désignent sous les noms de *Immunkörper*, *Zwischenkörper*, *Amboceptor*, etc.

La différence qui existe entre semblables cytotoxines provenant des espèces animales différentes, ne porte que sur la *cytase* (*alexine*) qui varie avec chaque animal.

En résumé, à chaque groupe cellulaire correspond dans la nature un seul anticorps, un seul fixateur, quel que soit l'animal qui le fabrique. La spécificité qui relie une cellule à son fixateur est aussi rigoureuse que celle qui existe entre le fixateur et l'antifixeur. Ces trois éléments, cellules, fixateur et antifixeur, sont si intimement liés entre eux qu'en constatant, au cours de notre étude, un antifixeur dans un sérum, il nous sera facile de remonter à son origine et d'en retrouver les stades intermédiaires¹.

*
* *

Le présent mémoire a pour but de démontrer que tout sérum renferme à l'état normal des anticytotoxines que nous considérons, en raison des faits exposés plus bas, comme des anti-autocytotoxines.

1. Nos expériences étaient complètement terminées, quand nous avons eu connaissance d'un grand mémoire publié tout récemment par MM. Ehrlich et Morgenroth (*Berliner Klinische Wochenschrift*, 1901, nos 21, 22). Les auteurs concluent à la multiplicité des substances fixatrices et antifixatrices, pour la même catégorie des cellules. Nous regrettons, étant donnée la complexité de plus en plus grande de la question, de ne pas pouvoir suivre ici, les auteurs dans leurs argumentations. Nous ferons seulement remarquer que malgré les nouvelles conceptions, très ingénieuses, des savants allemands, il nous est impossible d'interpréter nos expériences autrement que dans un sens tout à fait opposé aux idées soutenues par eux.

Voici les considérations qui nous ont engagé à chercher ces substances dans des sérums normaux, réputés jusqu'ici comme tout à fait indifférents vis-à-vis de leurs propres cellules.

La vie d'un animal peut être envisagée comme une suite ininterrompue de destructions des cellules, se remplaçant continuellement par de nouvelles générations de cellules jeunes. Nous nous sommes demandé ce que deviennent les cellules usées, incapables de servir l'organisme. On connaît le sort de ces cellules au point de vue morphologique; elles deviennent généralement la proie de gros mononucléaires qui les englobent et les digèrent à leur intérieur. Même dans les organes dits nobles, comme le cerveau, les cellules affaiblies n'échappent pas aux phagocytes; ainsi, sur les coupes de cerveau des chiens normaux, on voit des cellules nerveuses entourées de leucocytes qui s'appêtent à les digérer. Il en est de même pour le foie, le rein et les autres organes.

Pour ce qui concerne les globules rouges, leur destruction à l'intérieur des macrophages de la rate est un fait trop connu pour que nous soyons obligé d'y insister.

En présence de ces faits, nous nous sommes demandé si cette digestion des cellules par les propres phagocytes de l'animal ne saurait entraîner des conséquences fâcheuses pour les autres cellules du même animal. Etant donné que cette digestion intracellulaire des cellules par les phagocytes rappelle de tous points le mécanisme de la fabrication des cytotoxines en général, il y a lieu de se demander si, lors de cette autophagocytose physiologique que nous subissons d'une façon continue, nous ne fabriquons pas nous-mêmes des poisons pour nos propres cellules, soit, des auto-cytotoxines.

Il était inutile, bien entendu, de chercher dans le sérum ces autocytoxines, car l'expérience de tous les jours nous montre que les cellules, les globules rouges, par exemple, loin de se dissoudre rapidement dans leur propre sérum, s'y conservent, au contraire, admirablement bien dans l'immense majorité des cas¹. Mais si l'on ne peut pas constater dans un sérum normal la présence des auto-cytotoxines, cela ne veut pas encore dire

1. Faisons rappeler à ce propos que M. METALNIKOFF a réussi à obtenir, dans le laboratoire de M. METCHNIKOFF, une autopermotoxine réelle; c'est la seule autocytoxine qui soit connue jusqu'à présent.

qu'elles n'y sont pas; car l'organisme étant personnellement menacé par leur présence s'empresse peut-être de neutraliser leur effet en leur opposant des anticorps spécifiques, qui dans le cas présent seraient des *anti-autocytotoxines*. Guidé par ces considérations, nous nous sommes mis à chercher ces dernières dans les sérums normaux.

Afin de mettre en évidence les propriétés antitoxiques d'un sérum, il faut avoir tout d'abord la cytotoxine correspondante; par la raison que nous venons d'indiquer, il nous fut impossible de l'isoler du sérum du même animal; il a donc fallu s'adresser à une cytotoxine obtenue dans les mêmes conditions par un animal étranger, lequel, n'étant pas sensible, ne cherche pas à fabriquer en même temps une anticytotoxine.

Cette cytotoxine, fournie par l'animal étranger, est-elle identique à l'auto-cytotoxine fabriquée par l'animal sensible? A ceci nous pouvons répondre que, abstraction faite de la cytase, variant d'une espèce à l'autre, il n'y a aucune raison de croire que l'auto-cytotoxine, ou pour être plus précis, l'auto-fixateur des hématies humaines, par exemple, soit différent d'un fixateur de ces mêmes globules, si celui-ci provient d'une espèce étrangère, d'un lapin, d'un cobaye, ou d'une chèvre. Par une série d'expériences entreprises dans cet ordre d'idées, nous avons pu nous assurer que les fixateurs, actifs pour une certaine catégorie de cellules, mais fabriqués par des espèces animales différentes, sont identiques en ce sens qu'ils sont spécifiquement neutralisés par un seul et même antifixateur.

Nous ferons remarquer une fois pour toutes que bien que les considérations formulées plus haut s'appliquent à toutes les cytolytases, nos expériences ont porté exclusivement sur les hémolytases, celles qu'il est le plus facile de mettre en évidence.

Il va sans dire quisi notre théorie de l'auto-intoxication cellulaire est vraie, elle doit se justifier dans tous les cas où il y a auto-destruction des cellules, c'est-à-dire, elle doit s'appliquer à tous les êtres vivants. Il faut donc que toutes les espèces animales renferment des anticytolytases, soit des antihémolytases dans le cas particulier, avec toutes leurs propriétés et les caractères de spécificité que nous leur connaissons.

Étant donnée la complexité de ces recherches, nous avons

dû les limiter à un certain nombre d'animaux de laboratoire (lapin, cobaye, oie, poule, mouton ¹) et à l'homme.

Les résultats des recherches furent positifs dans tous les cas sans exception, ce qui nous autorise à conclure, avec un certain degré de probabilité, que la réaction anti-hémolytique de l'organisme est une réaction générale, en vertu de laquelle l'organisme lutte continuellement contre la destruction de ses propres hématies.

II

La recherche du pouvoir anti-hémolytique dans les sérums d'animaux normaux était réalisée d'après le principe que M. Bordet appliqua le premier au sérum d'animaux, vaccinés contre leur hémolysine spécifique.

Afin de ne pas tomber dans des redites inutiles, je ne rapporterai pas ici les nombreuses expériences faites avec chaque espèce animale, celles-ci étant toutes faites sur le même plan ; il suffira d'en décrire une avec détails pour se faire une idée nette du phénomène en général.

Parmi les différents sérums d'animaux que nous avons étudiés (cobaye, lapin, oie, poule, mouton), nous choisirons comme exemple celui du mouton ; les résultats obtenus avec ce sérum seront rapportés plus bas. Nous voudrions nous arrêter d'abord sur le sérum humain, que nous avons étudié avec une prédilection toute naturelle.

Les sérums humains que nous avons examinés provenaient tous, sauf un échantillon qui était du sérum normal, de malades d'âge et de sexe différents (épilepsie, 8, — cancer du sein, 4, — fièvre typhoïde, 3, — urémie, 2, — pneumonie, 1, — congestion pulmonaire, 1, — diabète, 1, — néphrite, 1, — purpura, 1, — syphilis, 1, — sérum normal de l'auteur ²).

1. Nous avons examiné aussi sous ce rapport les sérums de chien, de cheval et de bœuf; mais, en raison de la fragilité de leurs globules, il fut impossible de vérifier sur ces animaux la présence d'antihémolysines; nous reviendrons sur ce sujet avec plus de détails dans la partie expérimentale. (CHAP. II.)

2. Les sérums m'ont été très obligeamment fournis par MM. WIDAL et VAQUEZ, auxquels j'exprime ici ma profonde reconnaissance; je prie également mes amis MM. JEAN CHARCOT et R. PETIT, qui m'ont procuré plusieurs échantillons de sérum humain, d'accepter l'assurance de ma sincère et affectueuse gratitude.

Pour avoir de l'hémolysine vis-à-vis des globules rouges de l'homme, nous nous sommes adressé à du sérum de chèvre, immunisée avec du sang défibriné de l'homme. Nous employons ce sérum tantôt *tout entier*, lorsqu'il était frais, c'est-à-dire avec la cytase de la chèvre, tantôt nous le chauffons à 55° pour avoir seulement le fixateur (la sensibilisatrice), que l'on réactivait ensuite dans certains cas avec de la cytase de cobaye, dans d'autres cas avec celle de lapin ou bien avec celle de l'homme.

Quant aux globules rouges, nous nous sommes adressé souvent aux globules du même individu dont provenait le sérum; d'autres fois nous avons recours à nos propres globules; dans un cas comme dans l'autre, les globules étaient lavés 2-3 fois à l'eau physiologique à 7,5 0/00.

Voilà donc les trois éléments nécessaires pour l'expérience : sérum humain, hémolysine humaine et globules humains.

On prépare d'abord le mélange de sérum hémolytique avec du sérum humain, puis, après environ trois heures de contact, on ajoute des globules rouges émulsionnés dans de l'eau physiologique à 7,5 0/00.

En même temps, on dispose une série de tubes-témoins; dans ceux-ci, on met la même quantité d'hémolysine que plus haut, mais au lieu de sérum humain, on ajoute des doses égales de sérum de différents animaux (lapin, cobaye, mouton, poule, bœuf, cheval, bouc, chien), puis, après en contact de même durée, on ajoute des globules rouges, comme plus haut.

Afin d'éliminer l'action possible de la cytase des sérums humains et d'animaux, dans lesquels on cherchait l'action anti-hémolytique, on les chauffait tous préalablement à 56° pendant une demi-heure.

Or, voici ce que l'on a constaté déjà au bout de 2-3 heures de séjour à l'étuve, ou après 12-15 heures à la température de la chambre (15°): alors que dans tous les tubes-témoins renfermant des sérums d'animaux, on observe une diffusion notable de l'hémoglobine, ou même une dissolution complète des globules, dans des tubes contenant du sérum humain, on ne constate pas la moindre trace de dissolution, ou une diffusion d'hémoglobine extrêmement faible; d'où nous concluons que le sérum humain paralyse l'action dissolvante de l'hémolysine humaine vis-à-vis des globules humains.

Voici une de nos nombreuses expériences de ce genre :

On prépare l'hémolysine en mélangeant 1 partie de sérum frais de cobaye (cytase) avec 2 parties de sérum de chèvre immunisée contre le sang humain; ce sérum de chèvre est préalablement chauffé à 55°-56° pendant une demi-heure (fixateur). On met dans une série de petits tubes deux gouttes de ce mélange, puis on ajoute quinze gouttes de divers sérums qui vont être indiqués plus bas. Après plusieurs heures (3 heures) de contact, on ajoute une ou deux gouttes d'une émulsion très étendue de globules rouges de l'homme dans l'eau physiologique à 0,75 0/0.

L'expérience a été faite à 7 heures du soir; les tubes sont restés à la température de la chambre toute la nuit; le lendemain matin on constate les résultats suivants :

1) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes d'eau physiologique à
7,5 0/00.

Le liquide est rouge. Au fond du tube il reste encore un peu de globules intacts; la majeure partie est dissoute.

2) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum de lapin chauffé
à 55° (1/2 h.).

La dissolution des globules est moins avancée, il en reste encore un tiers de globules environ non dissous.

3) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum de mouton,
chauffé à 55° (1/2 h.).

La dissolution des globules est aussi prononcée que dans le tube n° 2.

4) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum de cheval, chauffé
à 55° (1/2 h.).

La dissolution des globules est aussi prononcée que dans le tube n° 2.

5) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum de bœuf, chauffé
à 55° (1/2 h.).

La dissolution des globules est presque complète.

6) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum de chien, chauffé
à 55° (1/2 h.).

La dissolution des globules est très prononcée, mais semble l'être un peu moins que dans le tube n° 2.

7) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum de cobaye,
chauffé à 55° (1/2 h.).

La dissolution des globules est aussi prononcée que dans le tube n° 2.

8) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum de bouc, chauffé
à 55° (1/2 h.).

La dissolution est plus avancée que dans le tube n° 2; elle est presque complète.

9) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum humain n° 1
(pneumonie), chauffé à 55°
(1/2 h.).

La dissolution est nulle; le sérum est aussi clair que dans le tube témoin ne renfermant pas d'hémolysine.

10) 2 gouttes de mélange hémolytique,
15 gouttes de sérum humain n° 2
(congestion pulmonaire), chauffé
à 55° (1/2 h.).

La dissolution est nulle, comme dans le tube n° 9.

- | | | |
|--|---|---|
| 11) 2 gouttes de mélange hémolytique, | } | On constate une diffusion d'hémoglobine extrêmement légère. |
| 15 gouttes de sérum humain n° 3 (épilepsie), chauffé à 55° (1/2 h.). | | |
| 12) 2 gouttes de mélange hémolytique, | } | La diffusion de l'hémoglobine est nulle, comme dans le tube n° 9. |
| 15 gouttes de sérum humain n° 4 (cancer) chauffé à 55° (1/2 h.). | | |

Nous répétons que cette expérience a été refaite avec chaque nouvel échantillon de sérum humain que nous avons pu nous procurer, et toujours avec le même résultat : l'action antihémolytique du sérum humain, par comparaison avec des sérums d'origine animale, a été manifeste dans tous les cas (24 cas) sans exception ; certes, on pourrait noter des différences, en comparant entre eux des sérums humains de diverses provenances, mais toujours le sérum humain, même le moins antihémolytique, protégeait notablement mieux les globules humains que n'importe quel sérum animal, essayé dans les mêmes conditions.

*
* *

Chaque hémolysine préparée se compose, comme nous le savons, des deux substances : cytase (alexine) et fixateur (sensibilisatrice). Il suffirait que, dans notre expérience, un de ces éléments fût neutralisé par le sérum humain, pour que l'effet hémolytique se trouvât supprimé.

On devait donc se demander si, dans l'expérience citée plus haut, l'hémolysine n'est pas paralysée simplement parce que la cytase de cette dernière rencontre dans le sérum humain une anticytase correspondante, supposition qui, *a priori*, n'a rien d'in vraisemblable.

Il a fallu donc chercher par des expériences appropriées les propriétés anticytasiques du sérum humain vis-à-vis des différentes cytases, puis choisir, pour réactiver le sérum fixateur, une ou des cytases vis-à-vis desquelles le sérum humain est sans action. Il est inutile d'allonger ce travail par l'exposé de toutes les expériences réalisées à cet effet ; qu'il nous suffise de dire que le sérum humain possède en effet déjà naturellement un pouvoir de neutraliser à un certain degré la cytase de la chèvre¹,

1. Au cours de nos études sur les anticytases naturelles, nous avons constaté que 25 gouttes de sérum humain empêchent 1 goutte de sérum frais de chèvre de dissoudre les globules de cobaye, alors que cette dissolution n'est pas empêchée par les sérums de cheval, de bœuf, de poule, ajoutés dans les mêmes proportions.

de sorte que, en se servant du sérum hémolytique non chauffé de chèvre, comme nous l'avons fait souvent au début de nos expériences, il y avait lieu de se demander s'il faut attribuer le pouvoir antihémolytique du sérum humain à sa propriété anticytastique ou bien à sa propriété antifixatrice.

Le doute est levé dès qu'on remplace la cytase de chèvre par celle de cobaye, de lapin, ou même par la cytase de l'homme.

En ajoutant au sérum fixateur chacune de ces cytases indiquées, vis-à-vis desquelles le sérum humain est sans action, ce dont nous avons eu soin de nous assurer par des expériences à part, on acquiert la certitude que dans l'expérience ci-dessus il s'agit véritablement d'une action purement antifixatrice et non anticytastique.

En déclarant qu'il s'agit là certainement d'une action antifixatrice, nous nous avançons pour l'instant, peut-être, au delà de ce que comporte l'expérience citée plus haut, qui ne juge directement que la question de l'anticytase. Il faut démontrer, en effet, que dans le sérum humain nous avons affaire à une véritable substance antifixatrice, et que celle-ci répond à tous les caractères connus des antifixateurs artificiels. Il faut donc démontrer qu'elle se comporte d'une façon déterminée vis-à-vis des températures élevées; puis, il faut qu'elle soit, et cela est un caractère de première importance, strictement spécifique.

Pour ce qui concerne l'influence des températures élevées, l'expérience est très facile à réaliser.

Nous savons déjà que ce pouvoir antihémolytique résiste bien au chauffage à 55°-56° pendant une demi-heure, puisque toutes nos expériences sont faites précisément avec des sérums chauffés (56°-55°).

Mais si on porte à 65°-68°, la température du bain-marie dans lequel on chauffe le sérum, et si on prolonge le chauffage pendant une ou deux heures, on ne tarde pas à s'apercevoir que le sérum humain perd complètement ou en grande partie son pouvoir de neutraliser l'hémolysine.

Lorsqu'on reprend l'expérience citée plus haut et que l'on mélange dans une série de tubes de l'hémolysine avec des sérums humains chauffés à 55°-56°; dans une autre série de tubes avec les mêmes sérums chauffés à 67°; et enfin, dans une troisième série, avec des sérums de divers animaux,

chauffés à 55°-56°, et que l'on ajoute ensuite (après plusieurs heures de contact) dans tous les tubes des globules humains, on constate ceci : dans tous les tubes de la première série le sérum reste aussi clair que dans des tubes témoins, qui ne contiennent pas d'hémolysine; par contre, dans les tubes de la deuxième et de la troisième série, il y a une diffusion très accentuée de l'hémoglobine ou même dissolution complète, et cela est aussi prononcé dans les uns que dans les autres.

En d'autres termes, le sérum humain chauffé à 67°-68° pendant une ou deux heures, se comporte vis-à-vis de l'hémolysine humaine comme n'importe quel sérum animal chauffé à 55°-56°, c'est-à-dire il n'est plus du tout antihémolytique.

Avant de passer à l'autre caractère qui est la spécificité, nous voudrions rapporter en abrégé une de nos expériences portant sur des sérums humains chauffés à des températures différentes.

On prépare l'hémolysine en faisant un mélange de parties égales de sérum chauffé de chèvre vacciné (fixateur) et de sérum frais de cobaye (cylase). On prélève de ce mélange 2 gouttes pour chaque tube, on ajoute 45 gouttes de différents sérums dont on cherche le pouvoir antihémolytique; puis, après plusieurs heures de contact, on met des globules humains émulsionnés dans de l'eau physiologique à 0,75 0/0.

1) 2 gouttes d'hémolysine, 45 gouttes d'eau physiologique à 7 0/00.	}	Dissolution complète.
2) 2 gouttes d'hémolysine, 45 gouttes de sérum de lapin, chauffé à 55°.		
3) 2 gouttes d'hémolysine, 45 gouttes de sérum humain (conges- tion pulmonaire), chauffé à 55°.	}	Diffusion d'hémoglobine ex- trêmement légère; le sérum est à peine teinté en rose.
4) 2 gouttes d'hémolysine, 45 gouttes du même sérum que dans le tube n° 3, mais chauffé à 67°.		
5) 2 gouttes d'hémolysine, 45 gouttes de liquide de vésicatoire (cancer), chauffé à 55°.	}	Dissolution presque complète des globules, comme dans le tube n° 2.
6) 2 gouttes d'hémolysine, 45 gouttes de même liquide chauffé à 7° 6.		
7) 2 gouttes d'hémolysine, 45 gouttes de sérum humain (diabète), chauffé à 55°.	}	Dissolution nulle.
	}	Dissolution complète.
	}	Diffusion d'hémoglobine presque imperceptible.

- | | | |
|---|---|---|
| 8) 2 gouttes d'hémolysine,
15 gouttes de même sérum (diabète),
chauffé à 68°. | } | Dissolution complète. |
| 9) 2 gouttes d'hémolysine,
15 gouttes de sérum humain n° 6
(épilepsie). | | |
| 10) 2 gouttes d'hémolysine,
15 gouttes de même sérum, chauffé à
67°-68°. | } | Le sérum a pris une teinte
rose très légère; les globules
sont intacts. |
| | | |
| | } | Dissolution complète. |
| | | |

Il ressort donc de cette expérience qu'un sérum humain, chauffé à 67°-68° pendant une ou deux heures, n'est pas plus antihémolytique qu'un sérum animal, alors que ce même sérum humain chauffé à 55°-56° possède un pouvoir antihémolytique très manifeste.

*
* *

Passons maintenant au deuxième caractère des antihémolysines, qui est la spécificité.

Si le sérum humain chauffé à 55° protège les globules humains contre la dissolution par l'hémolysine parce qu'il renferme réellement une antihémolysine, il est nécessaire que cette protection soit très spécifique; en d'autres termes, il faut que cette protection ne puisse pas s'étendre à d'autres globules que ceux de l'homme: puis il faut que cette protection soit surtout efficace en présence de l'hémolysine spécifique.

Rien n'est plus facile que de démontrer que le pouvoir protecteur du sérum humain est bien limité aux globules humains.

En cherchant dans les sérums normaux de divers animaux de laboratoire la propriété antihémolytique vis-à-vis de leurs globules respectifs, nous avons eu besoin de sérums étrangers pouvant nous servir de témoins; or, il nous est arrivé quelquefois d'employer à cet effet, entre autres sérums, aussi celui de l'homme, et toujours dans ces cas le sérum humain se montrait notablement moins protecteur vis-à-vis des globules étrangers que le sérum de l'animal auquel appartenaient ces globules.

Ainsi, par exemple, lorsqu'on mélange une hémolysine dirigée contre les globules de mouton avec du sérum humain, et que l'on ajoute ensuite des globules rouges de mouton, on constate que la dissolution de ces derniers n'est nullement empêchée par du sérum humain, alors que l'effet hémolytique est nul ou

peut s'en faut, dans les tubes où, au lieu de sérum humain, il a été ajouté la même quantité de sérum de mouton.

Et les exemples du même genre peuvent être multipliés à volonté.

Il s'ensuit donc que le sérum humain possède un pouvoir protecteur très restreint, et, autant que nos expériences permettent d'en juger, ce pouvoir s'exerce spécifiquement vis-à-vis des globules de l'homme.

Cette action protectrice spécifique du sérum vis-à-vis de ses propres globules, nous l'avons constatée également chez le cobaye, le lapin, le mouton, la poule et l'oie.

Avons-nous affaire ici à une action semblable à celle que nous connaissons pour les glycosides, ou est-ce un phénomène d'un ordre différent?

Pour ce qui concerne les glycosides (saponine, solanine, etc.), nous savons qu'en milieu salé ils jouissent d'un pouvoir hémolytique des plus marqués, et que ce pouvoir est notablement paralysé en présence d'un sérum sanguin. Si, par exemple, une dose déterminée de saponine est capable de dissoudre 1 c. c. de globules rouges émulsionnés dans de l'eau physiologique, il faut 10 ou 15 doses de saponine pour arriver à dissoudre la même quantité de globules rouges, lorsque ceux-ci sont additionnés d'un sérum sanguin. M. Hédon¹ a vu, et nous pouvons confirmer ses observations, que certains sérums protègent les globules contre une dose 20-25 fois hémolytique d'un glycoside.

D'après ce savant, « si les globules résistent dans le sérum à des doses de glycosides bien supérieures aux doses toxiques dans l'eau salée, cela tient à ce que les matières albuminoïdes du sérum sont un obstacle à l'hémolyse. »

Cette action protectrice du sérum vis-à-vis des glycosides est-elle comparable à l'action protectrice que nous constatons dans nos expériences?

Sans la moindre hésitation, nous répondons : non.

Tout en étant ressemblants au premier abord, ces deux sortes de phénomènes présentent deux caractères essentiellement différents :

1. E. Hédon, Sur l'hémolyse par les glycosides globulicides, et les conditions de milieu qui la favorisent ou l'empêchent, *Archives Internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 1904, vol. VIII, p. 381.

1° Bien que le pouvoir protecteur de différents sérums ne soit pas le même, comme c'est le cas dans nos expériences, M. Hédon a vu que « les globules d'une espèce déterminée ne sont pas mieux protégés par leur propre sérum, mais bien par des sérums étrangers et surtout par des sérums appartenant à des espèces très éloignées » ;

2° M. Hédon a vu également « que le chauffage du sérum à 60°-65° C., pendant plusieurs heures et à plusieurs reprises, ne lui enlève absolument rien de ses qualités protectrices, et même il paraît y gagner légèrement ».

Il est donc clair que, bien que la protection du sérum contre les glycosides et contre les hémolysines soit d'apparence du même ordre, en réalité le mécanisme en est profondément différent.

*
* *

Nous avons fait remarquer plus haut que l'on aura démontré la nature antihémolytique vraie de la substance protectrice du sérum humain quand il sera constaté que cette action protectrice ne s'étend pas à d'autres globules que ceux de l'homme, et puis que cette protection est efficace principalement en présence de l'hémolysine spécifique.

La première moitié de cette démonstration étant déjà faite, il nous reste à nous occuper de la seconde.

Certes, si les globules humains, mis en présence de l'hémolysine et du sérum humain, ne laissent pas diffuser leur hémoglobine simplement parce qu'ils sont protégés par ce sérum, cette action protectrice doit se manifester toujours, quelle que soit la nature de la substance hémolysante ; si, par contre, le sérum humain empêche la dissolution des globules parce qu'il neutralise spécifiquement l'hémolysine, il est clair que cette neutralisation n'aura pas lieu avec un corps dissolvant, envers lequel le sérum humain n'exerce pas un pouvoir antitoxique.

Pour savoir laquelle de ces deux hypothèses est la vraie, nous nous sommes adressé à des sérums qui dissolvent naturellement les globules rouges de l'homme. Ce choix nous a été dicté par cette considération que ces sérums naturellement hémolysants étant de par leur nature chimique beaucoup plus voisins des sérums spécifiquement hémolytiques que des glyco-

sides par exemple, on pourrait mieux apprécier la différence, si toutefois elle existait.

Nous arrêtaâmes notre choix sur le sérum de bœuf et sur celui de lapin; employés le jour de la saignée, tous les deux se montrent très hémolytiques vis-à-vis des globules humains.

L'expérience a été disposée identiquement de la même façon que celle rapportée à la page 79, avec cette différence qu'au lieu de l'hémolysine spécifique, nous avons employé l'hémolysine naturelle du sérum de bœuf ou de lapin. Si au cours de ces expériences on avait constaté dans différents tubes le même degré de diffusion d'hémoglobine ou de dissolution que dans l'expérience de la page 79, si en plus on avait remarqué que dans les tubes contenant du sérum humain la diffusion de l'hémoglobine est nulle, alors la conclusion aurait été évidente: nous aurions déclaré qu'ils s'agit dans ces deux expériences incontestablement d'une action protectrice ou conservatrice, inhérente au sérum humain, et non d'une action antihémolytique, dirigée spécifiquement contre l'hémolysine.

Or, en réalité les choses se passent tout autrement; voici une expérience, dans laquelle du sérum frais de lapin nous servait de substance hémolytique.

Dans une série de tubes, on fait un mélange de 3 gouttes de sérum frais de lapin et de 15 gouttes de différents sérums, chauffés à 56°. Puis, après 3 heures de contact, on ajoute des globules rouges de l'homme dans de l'eau physiologique à 7,5 0/00.

- | | | |
|---|---|--|
| 1) 3 gouttes de sérum de lapin,
15 gouttes d'eau physiologique, à
7,5 0/00. | } | Dissolution très avancée,
mais incomplète; il reste au
fond du tube une moitié de
globules intacts (1/2). |
| 2) 3 gouttes de sérum de lapin,
15 gouttes de sérum de mouton,
chauffé à 55°. | | Dissolution aussi prononcée
que dans le tube précédent
(n° 1). |
| 3) 3 gouttes de sérum de lapin,
15 gouttes de sérum de chien, chauffé
à 55°. | } | Dissolution prononcée, mais
un peu moins que dans le tube
n° 1; il reste environ 2/3 de
globules intacts. |
| 4) 3 gouttes de sérum de lapin,
15 gouttes de sérum de bouc chauffé
à 55°. | | Dissolution presque complète. |
| 5) 3 gouttes de sérum de lapin,
15 gouttes de sérum de lapin, chauffé
à 55°. | } | Dissolution nulle. |
| | | |

6) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum de bœuf, chauffé à 55°-56°.	}	Dissolution nulle.
7) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55° (épilepsie n° 6).	}	Dissolution nulle.
8) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55° (épilepsie n° 4).	}	Dissolution nulle.
9) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55° (épilepsie n° 3).	}	Dissolution aussi intense que dans le tube n° 1.
10) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 58° (épilepsie n° 7).	}	Dissolution aussi intense que dans le tube n° 1.
11) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55°-56° (épilepsie n° 1).	}	Dissolution aussi intense que dans le tube n° 1.
12) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes du même sérum humain que dans le tube n° 11, mais chauffé à 67°.	}	Dissolution notablement moins prononcée que dans le tube précédent (n° 1).

Nous voyons donc que, dès qu'on vient à remplacer l'hémolysine humaine spécifique par une hémolysine non spécifique, par du sérum de lapin, par exemple, les résultats changent du tout au tout. Certes, dans les tubes n°s 7 et 8, nous voyons que le sérum humain protège les globules humains; mais, à côté de cela, nous constatons que dans les tubes n°s 9, 10, 11, le sérum humain, provenant de trois malades différents, est incapable de neutraliser l'action hémolytique du sérum de lapin sur les globules humains, alors que dans les tubes n°s 5 et 6 cette action hémolysante est neutralisée complètement par le sérum de lapin et de bœuf; puis, chose curieuse, en comparant les tubes n°s 11 et 12, nous remarquons que le sérum humain (épileptique n° 1) protège notablement mieux les globules rouges lorsqu'il est chauffé à 67° que lorsqu'il est chauffé à 55°-56°.

La conclusion est claire : le sérum humain n'agit pas sur les globules de sang en tant que bon milieu conservateur; il protège bien ses globules, mais uniquement contre l'action dissolvante de l'hémolysine spécifique; dès qu'on emploie un autre

dissolvant, si proche qu'il soit de par sa nature du sérum hémolytique, on n'observe pas plus d'action protectrice par du sérum humain que par n'importe quel autre sérum animal.

Tels sont les faits; pour les traduire en langage de cytolyse, nous ne voyons qu'une seule formule qui est celle-ci : le sérum humain possède un pouvoir antihémolytique vis-à-vis de l'hémolysine humaine, et ce pouvoir est aussi strictement spécifique que celui des antihémolysines artificiellement préparées. Si nous nous servons des termes — hémolytique et antihémolytique — c'est uniquement dans l'intérêt de la clarté; en réalité, c'est du pouvoir fixateur et antifixateur qu'il s'agit.

Pour finir ce chapitre sur le sérum humain, nous voudrions noter un petit fait qui mérite d'être signalé.

Au cours de ce travail, nous avons eu souvent l'occasion de doser le pouvoir antihémolytique du sérum humain, ainsi que de tous les autres sérums étudiés sous ce rapport. Or, chose curieuse, la proportion entre les sérums neufs devant être employés et la quantité de fixateur à neutraliser a été dans la grande majorité des cas, et chez tous les animaux, à peu près la même que celle que M. Bordet a trouvée pour le pouvoir antifixateur de ses sérums artificiellement préparés (15 : 1 ou 20 : 1).

Pour le moment, nous nous contentons de signaler cette coïncidence sans en tirer aucune conclusion.

*
* *

La présence de l'antihémolysine dans du sérum humain a d'autant plus d'intérêt que ce n'est pas un fait isolé. Quand on s'adresse aux sérums de lapin, de cobaye¹, d'oie, de poule, de mouton, on constate invariablement le même fait, c'est-à-dire, chacun de ces sérums renferme à l'état normal de l'antihémolysine ayant les mêmes caractères de spécificité que ceux que nous avons observés dans du sérum humain.

1. Tout récemment (*Centralblatt für Bakter.* 1901, p. 175), M. Muller a publié un intéressant mémoire sur la production de l'antihémolysine et notamment de l'antifixeateur chez des lapins auxquels on injecte du sérum chauffé de poule (le sérum de poule non chauffé est hémolytique vis-à-vis des globules de lapin). A la fin de son article, l'auteur signale un fait qui l'a frappé au cours de ses recherches, à savoir que le sérum chauffé de cobaye est antihémolytique, ou mieux antifixeateur, vis-à-vis du sérum de lapin immunisé contre les globules de cobaye. M. Muller constate ce fait en passant sans y insister.

Après nous être étendu si longuement sur le sérum humain, il est inutile d'examiner individuellement chacun de ces sérums; disons seulement que, pour avoir dans chaque cas de l'hémolysine spécifique, nous nous sommes adressé tantôt au cobaye, tantôt au lapin; quelquefois nous avons, pour la même espèce de globules, de l'hémolysine provenant de cobaye et de lapin, ce qui nous permettait de juger comparativement de leurs fixateurs respectifs.

Nous nous contenterons de rapporter ici brièvement l'expérience avec du sérum de mouton.

Pour révéler la présence de l'antihémolysine dans ce dernier, nous avons immunisé avec du sang défibriné de mouton à la fois des cobayes et des lapins; nous avons essayé chaque fixateur séparément, en le réactivant dans les deux cas avec de la cytase de lapin; cette cytase est, à petite dose, sans action sur les globules de mouton.

Dans cette expérience, nous nous sommes servi de l'hémolysine provenant de lapin, vacciné contre les globules de mouton; il s'agissait donc du fixateur et de la cytase de lapin. Dans une série de tubes, nous avons mis en contact avec 2 gouttes de cette hémolysine (non dissociée) tantôt 20, tantôt 25 gouttes de divers sérums chauffés à 53-56°. Les sérums employés provenaient de mouton, de lapin, de l'homme (urémie), de bœuf, de cheval et de poule. Après plusieurs heures de contact, nous avons ajouté des globules de mouton, frais, lavés et émulsionnés dans de l'eau physiologique (à 0,75 0/0). Le lendemain, nous avons constaté dans tous les tubes contenant du sérum étranger une diffusion d'hémoglobine ou une dissolution plus ou moins prononcée des globules; seul, le tube contenant du sérum de mouton chauffé à 53° ou même non chauffé, est resté clair¹.

La même expérience, faite avec du fixateur provenant du cobaye et avec de la cytase de lapin, donna les mêmes résultats. Il en fut de même lorsqu'on faisait varier un peu l'expérience, en préparant d'abord le mélange du fixateur *seul* et du sérum à examiner, et n'ajoutant la cytase qu'à la fin. Nous avons employé les deux procédés concurremment pour tous les fixateurs de mouton et de l'homme.

*
* *

Cette expérience, qui démontre la présence de l'antihémolysine dans du sérum normal de mouton, est intéressante encore à un autre point de vue.

1. Le sérum de chèvre renferme naturellement une substance protectrice vis-à-vis des globules de mouton, à un degré très prononcé.

Elle nous montre que, quel que soit l'animal fournisseur de l'hémolysine, la nature du fixateur reste la même. Nous trouvons un autre exemple du même genre pour le fixateur des globules humains. Nous avons vacciné avec du sang humain une chèvre, des lapins et des cobayes. Or, tous ces fixateurs se sont comportés de la même façon, en présence de sérums humains et d'animaux; d'où nous concluons que tous ces fixateurs, spécifiques pour la même espèce de globules, ne font qu'un.

Quand on compare entre eux simultanément les trois fixateurs des globules humains (chèvre, lapin, cobaye), ou bien les deux fixateurs des globules de mouton (lapin, cobaye), on constate que, combinés à la même cytase, ces fixateurs ne diffèrent entre eux que quantitativement; ceci peut tenir au fait que les animaux n'ont pas été immunisés au même degré, ou bien à ce que les différents fixateurs, placés dans des milieux différents, ne présentent pas la même affinité pour la même cytase. La parenté des fixateurs entre eux ressort même de l'examen des détails. Ainsi, lorsqu'on examine comparativement une série de sérums mélangés à une hémolysine, on voit qu'il y a des sérums qui empêchent la dissolution plus que les autres; on peut même construire sous ce rapport toute une échelle de sérums, pour chaque espèce des globules. Or, quel que soit le fixateur employé, cette gradation dans le degré de solubilité suit le même ordre à peu d'exceptions près, ce qui nous apporte un argument de plus en faveur de l'identité des fixateurs de provenances différentes.

Ceci établi, il n'y a qu'un pas à faire pour admettre que le fixateur fabriqué par l'animal, lors de la résorption de ses propres globules, ou l'auto-fixateur, est identique au fixateur fabriqué par l'animal étranger.

La présence d'anti-auto-fixateur dans du sérum normal devient alors très compréhensible, et l'on s'explique d'une manière bien naturelle comment l'auto-fixateur et l'anti-auto-fixateur prennent naissance au cours de la vie physiologique de l'animal¹.

1. Avant de terminer le chapitre sur les propriétés antibémolytiques des sérums normaux, nous voudrions faire part au lecteur d'une objection qu'à un moment donné nous avons cru pouvoir formuler contre nos propres conclusions.

Le fait que le sérum humain, par exemple, empêche la dissolution pes

* *

Le désir de vérifier le principe de l'auto-protection cellulaire sur le plus grand nombre possible d'espèces animales nous a fait examiner, en plus des sérums indiqués, aussi ceux de cheval, de chien et de bœuf. Nous avons immunisé toute une série d'animaux avec du sang défibriné de cheval, de bœuf et de chien et quand nous avons été en possession d'hémolysines puissantes, nous commençâmes à chercher la propriété antihémostatique dans ces sérums comme nous l'avions pratiqué pour d'autres espèces.

Or, quelle ne fut pas notre déception quand nous constatâmes que ce principe n'est pas du tout applicable ni au sérum de cheval, ni à celui de bœuf, ni surtout à celui de chien. Lorsque, dans une série de tubes, nous fîmes le mélange d'hémolysine de chien avec différents sérums chauffés, le sérum de chien y compris, et qu'au bout de quelques heures nous y ajoutâmes des

globules humains beaucoup mieux que ne le font les sérums des différents animaux, pourrait s'expliquer, peut-être, avons-nous pensé, par le fait que ces sérums d'animaux renfermeraient une substance fixatrice (sensibilisatrice) naturelle qui fait défaut dans le sérum humain; qu'il en serait de même pour le sérum de lapin vis-à-vis des globules de lapin, dans le sérum d'oie vis-à-vis des globules d'oie, etc. On s'expliquerait alors pourquoi les sérums étrangers empêchent moins la dissolution des globules donnés que leurs sérums propres. Or, il suffit d'examiner cette hypothèse de près, même en admettant qu'elle soit juste dans toute l'acception du terme, ce qui n'est pas le cas, pour s'assurer que la conclusion que nous avons tirée de nos expériences conserve toute sa rigueur.

L'hypothèse de fixatrices naturelles est certainement vraie dans certains cas isolés. Ainsi, nous pensons que le sérum de lapin, par exemple, renferme une fixatrice pour les globules humains, ou mieux, une substance qui favorise la dissolution de ces derniers en présence de l'hémolysine; mais cette propriété, qui est déjà très peu prononcée dans le sérum de lapin, existe à l'état d'ébauche dans certains autres sérums et n'existe pas du tout dans la majorité des cas.

Pour ce qui concerne le sérum de lapin, il est facile de mettre en évidence sa propriété fixatrice préformée, si on compare le sérum chauffé à 55° avec le même sérum chauffé à 68° pendant 1-2 heures; on constate alors que, contrairement à la majorité des sérums, ce dernier, chauffé à 68°, empêche la dissolution des globules humains notablement mieux que le sérum à 55°, dans lequel la substance sensibilisatrice n'a pas été détruite.

Mais le sérum de lapin, même débarrassé de sa substance fixatrice, est encore loin d'empêcher la dissolution des globules humains, en présence d'une hémolysine, aussi bien que le sérum humain. L'objection que nous avons formulée plus haut se trouve donc de la sorte dénuée de fondement.

globules de chien, nous vîmes le lendemain que, dans tous les tubes la dissolution de globules était très prononcée, et qu'elle était au maximum dans le tube contenant du sérum de chien, là précisément où nous nous attendions à trouver des globules complètement intacts.

Le même phénomène, quoique sous une forme plus atténuée, fut constaté pour les globules de cheval et de bœuf.

L'expérience fut répétée plusieurs fois avec des doses d'hémolysine de plus en plus petites, et toujours avec le même résultat décourageant.

Or, en cherchant un peu, nous avons vu que cette exception à la règle n'en est pas une, et que les résultats si inattendus de l'expérience tiennent simplement à la fragilité des globules de cheval, de bœuf et de chien; ces derniers sont particulièrement fragiles.

Il suffit d'ajouter des globules rouges de chien à différents sérums chauffés à 55°, de les agiter de temps à autre, pour obtenir une hémolyse très prononcée, sans que l'on fasse intervenir l'hémolysine spécifique; et, chose étrange, contrairement à ce que l'on observe pour les globules de la grande majorité d'espèces animales, les hématies de chien, de bœuf et aussi de cheval, qui se détruisent si facilement dans des sérums sanguins, même chauffés, restent complètement intacts dans de l'eau physiologique (à 0,75 0/0) et cela pendant plusieurs jours de suite.

Comme la diffusion de l'hémoglobine dans le sang de cheval et celui de chien s'effectue déjà spontanément sans hémolysine, il est tout naturel que nous ayons complètement échoué dans nos recherches d'antihémolysines.

*
* *

En résumé, sur neuf espèces animales que nous avons étudiées (cobaye, lapin, poule, oie, mouton, homme, cheval, chien et bœuf), nous avons constaté le pouvoir antihémolytique dans six cas; les trois cas négatifs, qui semblaient au premier abord présenter une exception au principe de l'autoprotection des cellules, trouvent en réalité une explication simple et n'infirment nullement la règle.

*
* *

Au cours de ces expériences, nous avons eu souvent à cher-

cher le pouvoir anticytasique de différents sérums par rapport à des cytases d'animaux différents.

Nous comptons revenir sur ce sujet avec plus de détails une autre fois ; ici nous voudrions seulement attirer l'attention sur la question des auto-anticytases¹.

Disons de suite que le fait de la présence dans un sérum normal d'auto-anticytase est loin d'être aussi général que celui d'auto-antifixeateur².

Si peu que l'on soit renseigné sur la nature des fixateurs, on sait au moins dans quelles conditions elles prennent naissance, on peut les créer à volonté ; or, pour ce qui concerne les cytases, se trouvant normalement dans le sérum normal et pouvant agir sur les cellules d'autres espèces, nous en savons encore beaucoup moins ; nous ignorons complètement les conditions nécessaires pour leur production, de même que leur rôle physiologique dans la nature. Le seul fait certain est que les cytases contribuent à la dissolution des éléments cellulaires, imprégnés de fixateurs ; peut-être donnent-elles lieu, à ce titre, à des phénomènes d'auto-intoxication, ce qui expliquerait la présence d'auto-anticytase dans quelques sérums normaux.

Au reste, ce n'est qu'une hypothèse. Ce qui est un fait expérimental, c'est la propriété que possède le sérum de lapin, chauffé à 55°, de neutraliser l'action de sa propre cytase.

Ainsi, nous savons que le sérum frais de lapin dissout facilement à certaines doses les globules rouges de cobaye ; or, si l'on ajoute à un tel sérum de lapin une quantité déterminée (10 parties environ) du même sérum ou d'un sérum d'un autre lapin, préalablement chauffé à 55°-56°, on empêche la dissolution de globules de cobaye de se faire, tandis que l'addition d'un sérum chauffé d'un autre animal (oie, poule, bœuf, bouc, homme, etc.) n'empêche pas l'action dissolvante de la cytase de lapin.

En désignant les substances anticytolytiques sous les termes auto-anticytase ou auto-antifixeateur, nous voulons indiquer le fait brut qu'il s'agit d'un anticorps spécifique d'un sérum vis-à-vis de la cytase ou du fixateur de même espèce ; les termes anti-autocytase ou anti-autofixeateur impliquent l'idée que c'est l'animal lui-même qui fabrique à la fois les cytolytases et les anticytolytases correspondantes.

2. Tout dernièrement (*Soc. de biol.*, 6 juillet 1901), MM. Camus et Pagnier ont signalé le fait intéressant que, dans certains cas, le sérum humain chauffé empêche le sérum humain non chauffé de dissoudre les globules de lapin.

Nous avons voulu savoir si cette action empêchante du sérum chauffé de lapin s'exerce spécifiquement vis-à-vis de la cytase de lapin, ou bien si elle existe également lorsqu'on fait agir sur les globules de cobaye une cytase d'un autre animal, celle de mouton ou de bœuf, par exemple.

L'expérience, réalisée avec le sérum frais de mouton et de bœuf, nous a montré que l'action empêchante ou protectrice du sérum chauffé de lapin disparaît complètement dès que l'on fait agir sur les globules de cobaye une autre cytase que celle de lapin.

Il s'ensuit donc que, dans le sérum chauffé de lapin, nous avons affaire, non pas à une propriété empêchante ou protectrice, d'une manière générale, mais bien à une propriété spécifique, en ce sens que celle-ci ne se manifeste que vis-à-vis de la cytase de lapin; c'est donc une véritable anticytase que nous observons dans du sérum normal de lapin.

Dans du sérum normal de cobaye, on trouve, à côté de la propriété anticytasique, aussi la propriété protectrice qu'il est souvent difficile de dissocier.

*
* *

CONCLUSION

L'homme et les animaux fabriquent normalement pour leurs propres globules rouges de l'antihémolysine qui est très probablement de l'anti-auto-hémolysine.

*
* *

Dans tout ce travail nous n'avons parlé que de l'antifixeateur actif pour les globules rouges; mais c'est la facilité de la technique qui, seule, nous a déterminé à étudier de préférence cette catégorie de cellules. Il y a tout lieu de croire qu'à chaque catégorie de cellules, capables de créer une cytotoxine, correspond dans le sérum sanguin une anticytotoxine spécifique, ou plutôt un antifixeateur.

L'équilibre entre le fixateur et l'antifixeateur doit être réglé d'une part par le degré de destruction des cellules et, d'autre part, par la force de l'organisme de réagir contre cette destruction.

Cet équilibre s'établit probablement avec le concours et peut-être à l'intérieur même des leucocytes qui président à la

création de ces deux substances, et qui laissent échapper ces dernières dans le sérum, lors de la coagulation du sang. Les choses doivent se passer ainsi à l'état physiologique. Il serait intéressant de voir comment s'opère la réaction antifixatrice, laquelle est évidemment une réaction de défense, à l'état pathologique, dans les cas où une catégorie déterminée de cellules est lésée; ainsi on peut se demander si, dans les maladies portant sur les organes hémopoïétiques, par exemple, la réaction antihémostatique s'opère avec la même intensité qu'à l'état normal. On peut se demander même si la réaction antifixatrice n'intervient pas dans les phénomènes d'atrophie sénile, surtout depuis que M. Metchnikoff a mis en lumière le rôle des macrophages dans cet ordre de processus.

Juillet 1901.

Errata dans l'article de MM. NICOLLE et ADIL-BEY.

(Numéro du 23 septembre.)

Page 715. — Ligne 25. — Lire « forme des jeunes animaux » et non « forme chez les jeunes animaux ».

Page 716. — Légende de la courbe n° 1. — Lire « Crimée-Anatolie » et non « Crimée et Anatolie ».

Page 717. — Ligne 4. — Lire « virus de passage » et non « sérum de passage ».

Page 718. — Au chapitre *Dilution du virus*, rétablir ainsi la seconde phrase qui a été tronquée « 1/60 de c. c. de sang, dilué dans 1^{cc},5 d'eau physiologique, tue l'animal qui le reçoit (sous la peau); 1/60 de c. c., dilué dans 500 c. c. d'eau physiologique, ne produit aucun effet, mais vaccine; 1/60 de c. c., dilué dans un litre d'eau physiologique, se montre inactif. »

Page 718. — Ligne 34. — Lire « émulsion de rate gardée » et non « gardés ». La rate a été conservée *in toto* dans l'eau salée.

Page 719. — Ligne 19. — Lire « 10 gouttes » au lieu de « 8 gouttes ».

Ligne 24. — Lire « 8 gouttes » au lieu de « 10 gouttes ».

Page 721. — Légende de la courbe n° 3. — Après « 78-93 » ajouter « race d'Anatolie, 1 an ».

Page 723. — Légende de la courbe n° 6. — Lire « 78-49 » au lieu de « 48-49 ».

Page 730. — Légende de la courbe n° 14. — Lire « 28 II » au lieu de « 18. II » et « sérum sec 0,5 » au lieu de « sérum sec 0,15 ».

Page 732. — Légende de la courbe n° 19. — Après « 77-8 » ajouter « race mixte (Crimée-Anatolie) 1 an ».

SUR LE

BACILLE PESTEUX ET LES INJECTIONS INTRAVEINEUSES MASSIVES

DE SÉRUM ROUX-YERSIN DANS LE TRAITEMENT DE LA PESTE

PAR M. J. LIGNIERES

A la suite d'une mission que m'avait confiée M. le comte Sala, ministre de France à Buenos-Aires, je lui adressai un rapport sur l'épidémie de peste bubonique qui sévit au Rosario et à Buenos-Aires (1899-1900). J'y indiquais le résultat de mes observations notamment sur la nature de la maladie, son étendue, son importance, les caractères morphologiques, culturels et pathogènes, le bacille de Yersin, l'action thérapeutique et préventive du sérum.

Aujourd'hui, les publications sur la peste bubonique sont trop nombreuses pour qu'il soit utile de reproduire ce rapport *in extenso*. Néanmoins, je ne crois pas sans intérêt de faire connaître quelques points qui me paraissent intéressants ¹.

De mon étude bactériologique et expérimentale de la peste, je ne retiendrai que deux faits.

Nous savons, depuis le travail de la commission allemande de Bombay, que le bacille de Yersin pousse à des températures basses; cette propriété a même été utilisée comme moyen d'isolement du bacille pesteux.

Il y a plus: non seulement on peut cultiver le bacille de Yersin au-dessous de 25°, mais encore il est indispensable d'éviter l'étuve à 37-38° lorsqu'on fait des cultures diagnostiques avec des produits pesteux provenant de l'homme, de rats ou d'animaux d'expériences. Si le microbe de la peste s'habitue vite à croître à l'étuve (37°) sur nos milieux artificiels, sa première culture est plus difficile; elle peut même manquer.

1. Une partie de mon rapport est publiée dans le *Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire*, Contribution à l'étude des septicémies hémorragiques, août 1900.

Voilà le point nouveau que j'ai maintes fois constaté dans mes expériences. Ainsi le sang d'un rat pesteux trouvé dans une habitation infectée, ensemencé sur des tubes de gélose dont la moitié est laissée au laboratoire (18-20°) et l'autre placée à l'étuve à 38°, donnera parfois des résultats très différents.

Tandis que les cultures mises à l'étuve pourront ne montrer aucune colonie pesteuse même après 4 jours, celles placées à 18-20° présenteront de belles et nombreuses colonies.

Si, d'autre part, on retire les cultures restées stériles de l'étuve à 38° pour les mettre au-dessous de 25°, on verra les colonies apparaître.

Il ne faut donc pas employer exclusivement l'étuve à 37-38° pour la recherche du bacille pesteux dans les organes infectés, si on ne veut courir le risque d'un échec.

Le second point sur lequel je désire attirer l'attention, c'est l'aspect spécial très caractéristique de la culture pesteuse sur pomme de terre à 15-20°.

A la température de l'étuve (37-38°), la culture sur pomme de terre est très maigre ou nulle. A 15-20° au contraire, on a toujours un développement visible entre le quatrième et le sixième jour, sous la forme d'un enduit transparent, peu épais, vernissé, blanchâtre. Lorsqu'on fait une seconde culture sur pomme de terre avec la première, on obtient un développement facile. La couche est plus visible, d'abord plate, uniforme, puis, après 8, 10 ou 15 jours, on voit se former de petites élevures parfaitement rondes, légèrement jaunâtres, si denses et si compactes qu'on les détruit très difficilement. Cette culture a alors un aspect *perlé* très caractéristique. Les autres cultures sont toutes perlées.

A propos du traitement sérothérapique de la peste, je crois intéressant de donner connaissance des quelques faits suivants :

Avec l'autorisation de M. le Dr Archambault, directeur du lazaret du Rosario, j'ai eu l'occasion de montrer l'efficacité évidente du sérum Roux-Yersin dans le traitement de la peste. Nous pûmes constater facilement, comme MM. Calmette et Salimbeni, que l'action thérapeutique du sérum est d'autant plus sûre qu'on agit plus vite et à des doses plus élevées, surtout intra-veineuses.

L'insuffisance de la quantité du sérum dont nous disposions m'avait engagé fortement, dès le début, à demander au Dr Archam-

bault d'employer presque exclusivement les injections intra-veineuses à haute dose, ce qui lui donna d'ailleurs d'excellents résultats.

Malheureusement le si dévoué directeur du lazaret fut changé, et nos observations au Rosario prirent fin.

De son côté, et probablement sans connaître exactement les faits indiqués plus haut, le D^r Penna, professeur de clinique médicale à la Faculté de Buenos-Aires, directeur du lazaret de cette ville, entreprenait un peu plus tard le traitement sérothérapique de la peste.

J'ai pu voir plusieurs de ses malades traités à l'aide du sérum Roux-Yersin, étudier leur histoire clinique, la marche de la maladie, et me convaincre que le D^r Penna avait fait un pas en avant dans le traitement sérothérapique de la peste par l'application des injections intra-veineuses massives.

Il a montré, en effet, qu'on peut même juguler en 48 heures la maladie grave par l'injection intra-veineuse et d'un seul coup de 60 c. c. de sérum antipesteux, en ayant soin de faire une nouvelle injection intra-veineuse de 40 c. c. après 12 ou 24 heures.

Pour ma part, je suis convaincu qu'en agissant ainsi et en complétant les jours suivants ce traitement par deux injections sous-cutanées de 20 à 40 c. c. de sérum espacées de 24 heures, on arriverait, surtout chez les pesteux traités de bonne heure, à sauver 90 pour cent des malades.

Si le D^r Penna a eu encore 19,3 0/0 de mortalité sur 39 traités, tandis que les non-traités succombaient dans la proportion de 50 0/0, c'est qu'il a eu à sa disposition une si petite quantité de sérum que souvent il a dû le marchander à ses malades.

L'injection de 60 c. c. de sérum par la voie sanguine n'offre guère, à mon avis, plus de dangers que celle qui consiste à en injecter seulement 20 c. c.

En poussant très doucement l'injection et en arrêtant un instant dès qu'apparaissent des phénomènes graves, notamment la suffocation avec cyanose de la face, on évite les accidents mortels. M. Penna ne signale aucun décès imputable à l'injection massive de sérum; de mon côté, je n'en ai jamais constaté.

Quant aux injections préventives pratiquées plusieurs fois sur tout le personnel de mon laboratoire et sur moi-même, elles se sont montrées aussi inoffensives qu'efficaces.

EXISTENCE DES ANOPHELES EN GRAND NOMBRE

DANS UNE RÉGION D'OU LE PALUDISME A DISPARU

PAR M. LE D^r ÉTIENNE SERGENT

Depuis les recherches de Grassi, établissant la relation qui existe entre le paludisme et la présence d'*Anopheles* en Italie, de nombreuses observations, faites en plusieurs points du globe, sont venues confirmer ces résultats.

D'autre part, dans les localités où l'endémie palustre est inconnue, comme la Nouvelle-Calédonie, on n'a point trouvé d'*Anopheles* ¹. Les moustiques du pays sont représentés par le genre *Culex* seul.

En Grande-Bretagne, ces résultats n'ont pas été confirmés par les recherches de Nuttall ², qui a trouvé des *Anopheles* dans des localités d'où le paludisme a totalement disparu, et même là où le paludisme n'a jamais existé.

Nous avons pratiqué, durant l'été de 1901 (juillet-août-septembre), des recherches sur les Culicides des bords de l'Essonne, affluent de la Seine; sur les bords de cette rivière régnait autrefois, d'après les médecins locaux, l'endémie palustre : elle a disparu aujourd'hui.

L'Essonne, affluent de la Seine, touche, sur une étendue approximative de 80 kilomètres, à trois départements du centre de la France : Loiret, Seine-et-Marne et Seine-et-Oise. Elle prend naissance sur les confins nord de la forêt d'Orléans, traverse l'ancienne province du Gâtinais, pays boisé, humide; puis le Hurepois, couvert de forêts et d'étangs, où elle s'élargit avant de se jeter dans la Seine à Corbeil. Elle reçoit le nom d'OEuf dans la première partie de son cours, jusqu'à Aulnay-la-Rivière,

D'après les médecins locaux, l'endémie palustre qui aurait existé autrefois sur les bords de l'Essonne a disparu aujourd'hui.

Sur 14 médecins ³ qui ont bien voulu répondre à nos questions touchant le paludisme dans la région :

1. LAVERAN, Au sujet de Culicides recueillis à Djibouti et en Nouvelle-Calédonie, *Soc. de biologie*, 1^{er} juin 1901.

2. NUTTALL, The geographical distribution of *Anopheles* in relation to the former distribution of ague in England, in the *Journal of Hygiene*, vol. 1, n° 1, janvier 1901.

3. D^{rs} Narbonne (Chambon); Lauret (Neuville-aux-Bois); Augé père, Augé Aug., Prudhomme (Pithiviers); Papillon, Nouët (Puisseaux); Penot, Billard, Guyard (Malesherbes); Dupeu (Maise); Laroche (Milly); Leron (Chilleux-aux-Bois); Durey-Comte (Corbeil).

Un seul aurait vu, il y a plus de 20 ans, 4 ou 5 cas de fièvre paludéenne; il ne se rappelle plus le type qu'ils représentaient;

Neuf n'ont jamais observé de cas de paludisme;

Trois ont observé des cas *rare*s de névralgies faciales cédant à la quinine;

Un aurait observé, il y a 3 ans, un cas de fièvre paludéenne chez un enfant, *fièvre quotidienne cédant à la quinine*.

En somme, d'après ces renseignements, on peut dire que l'endémie palustre n'existe pas sur les bords de l'Essonne, où nous avons trouvé des *Anopheles* en grand nombre.

Sur une longueur d'environ 80 kilomètres, nous avons fait nos recherches sur 30 mares, dans des localités distantes en moyenne de 3 à 4 kilomètres; nous avons recueilli des larves d'*Anopheles* dans 22 de ces mares.

Nuttall¹ insiste sur l'importance *numérique* de la distribution des *Anopheles*, et dit que ces observations *de nombre*, quoique facilement erronées, n'en ont pas moins une valeur relative :

« We are forced to conclude, dit-il, that it is not a matter of the geographical distribution of *Anopheles* as much as of their numerical distribution. We are fully aware that numerical estimates permit a considerable degree of error. Nevertheless they would always possess a relative value.

Or, nous avons pu comparer nos recherches sur les bords de l'Essonne, au point de vue *numérique*, avec celles que nous avons faites l'année dernière, aux mois d'octobre et de novembre, aux environs d'Alger, dans des foyers avérés de paludisme.

Nous avons trouvé des *Anopheles* plus facilement et en bien plus grand nombre sur les bords de l'Essonne qu'à Maison-Carrée et au Jardin d'Essai, foyers de paludisme près d'Alger. De plus, tandis que dans ces dernières localités, la proportion des *Anopheles* par rapport aux *Culex* était environ de 1/20, sur les bords de l'Essonne nous avons trouvé ce rapport égal à 1/10, approximativement.

Les *Anopheles* recueillis dans la région qui nous occupe appartiennent aux espèces suivantes : *Anopheles maculipennis* (*vel claviger*), *Anopheles bifurcatus*.

La carte ci-jointe indique la distribution des *Anopheles* sur

1. NUTTALL, loco cit.

TABLEAU DE DISTRIBUTION DES ANOPHELES

JUILLET, AOUT, SEPTEMBRE 1901.
(B indique *A. bifurcatus*; M, *A. maculipennis*.)

DÉPARTEMENT	ENDROIT	Hauteur au-dessus de la mer.	ESPÈCE	NOTES	DATE
LOIRET	MALESHERBES.	Mètr. 400	B	Dans un tonneau recueillant l'eau de pluie. <i>Culex pipiens</i> et <i>annulatus</i> . Au centre du village.	15 juillet 1901
LOIRET	PINSON.	80	M	Ruisseau séparé artificiellement de l'Essonne. Eau stagnante, pure. Prêles, pas de <i>Culex</i> . Poissons.	5 août.
SEINE- ET-OISE	BOIGNEVILLE.	80	B	A un kilomètre du village. Trou d'eau sale de 0 ^m ,25 de profondeur. <i>Culex</i> . Autour de la flaque d'eau, menthe sauvage.	7 août.
SEINE- ET-MARNE	VILLETARD.	76	M	Fossé dans un jardin. Eau pure. <i>Culex pipiens</i> . Menthe sauvage sur les bords.	7 août.
LOIRET	DIMANCHEVILLE.		B	Fossé dans un jardin. Eau très sale. <i>Culex pipiens</i> .	9 août.
SEINE- ET-OISE	CHEVRAINVILLE.	69	B	Ornière creusée par la roue d'un chariot, 0 ^m ,10 de profondeur. Nombreux <i>Anopheles</i> avec <i>Culex</i> .	13 août.
SEINE- ET-OISE	Ferme BONNEVAUX près GIRONVILLE.	67	B M	Mare d'eau très sale.	13 août.
SEINE- OISE	Près GIRONVILLE.	68	B	Trou à chaux au milieu de jardins. Eau sale. Le trou a 1 ^m ,70 de profondeur, 0 ^m ,30 d'eau au fond.	13 août.
SEINE- ET-OISE	Entre COURCELLES et BOIGNEVILLE.	70	B	Trou d'eau au milieu des bois. 1 m. de profondeur. <i>Culex</i> .	13 août.
LOIRET	PINSON. (Derrière le moulin.)	79	B	Même ruiss., où le 5 août il a été recueilli des <i>Anoph. maculipennis</i> .	15 août.
SEINE- ET-OISE	BOUTIGNY.	67	B	Trou d'eau dans le jardin des employés de chemin de fer. Gare de Boutigny. Eau pure. <i>Culex</i> .	17 août.

DÉPARTEMENT	ENDROIT	Hauteur au-dessus de la mer	ESÈCE	NOTES	DATE
SEINE- ET-OISE	JARCY.	Mètr. 59	B	Trou d'eau au milieu de jardins, près le passage à niveau <i>Culex</i> .	17 août.
SEINE- ET-OISE	AUDIGERS.	60	B M	Trou d'eau au milieu de jardins.	17 août.
SEINE- ET-OISE	MAISSE.	64	B M	Trou d'eau dans le jardin de la gare Eau sale.	17 août.
SEINE- ET-OISE	LA-FERTÉ- ALAIS.	55	M	Trou d'eau au milieu de jardins près de la rivière. <i>Culex</i> .	20 août.
SEINE- ET-OISE	BALLANCOURT.	50	M	Diverticule de l'Esnonne, séparé de lui artificiellement. Pas de poissons. <i>Nenuphars</i> . Roseaux.	20 août.
LOIRET	AULNAY- LA-RIVIÈRE.	90	B M	Ornière dans un champ, près de la rivière. <i>Culex</i> .	19 sept.
LOIRET	BONDAROY près PITHIVIERS.	100	M	Trou d'eau dans jardin. Très nombreux <i>Anopheles</i> . <i>Culex</i> .	19 sept.
SEINE- ET-MARNE	Entre AUXY et VILLETARD, au lieu appelé <i>Les Roches</i> .	78	M	Ancien lavoir près de la route. En juillet, août, pas d' <i>Anopheles</i> . En septembre, <i>Anopheles</i> .	24 sept.
SEINE- ET-OISE	MENNECY.	54	B	Bassin dans un jardin, près de la rivière. Eau sale.	26 sept.
LOIRET	COURCY.	125	B	Fond d'un étang à moitié desséché. <i>Culex</i> . Eau sale.	28 sept.
LOIRET	CHILLEURS-AUX-BOIS.	123	B	Flaque d'eau sale. <i>Culex</i> .	28 sept.

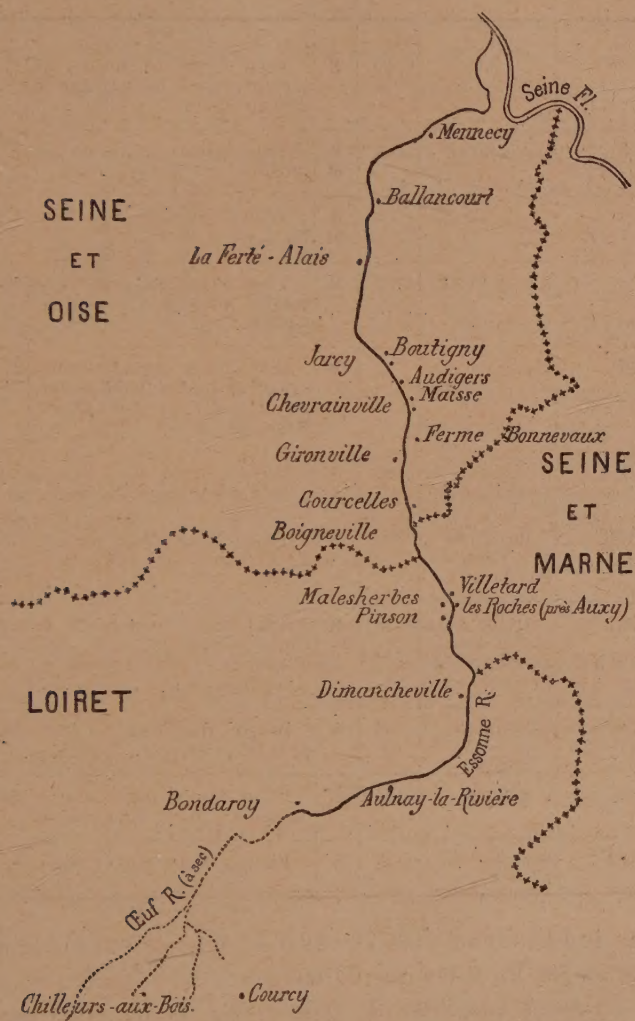
les bords de l'Esnonne. Des larves d'*Anopheles* ont été trouvées dans toutes les localités qui figurent sur cette carte.

Les larves d'*Anopheles* (*A. bifurcatus*, *A. maculipennis*) que nous avons recueillies étaient presque toujours en compagnie de larves de *Culex*.

Nous avons récolté souvent des larves d'*Anopheles* dans des mares à eau très sale; sur 22 mares à *Anopheles*, 9 contenaient de l'eau sale, boueuse. A Chevrainville, de nombreuses larves

d'*A. bifurcatus* ont été trouvées dans une ornière creusée par la roue d'un chariot, au milieu d'un chemin vicinal.

Sur les bords des mares naturelles à *Anopheles*, nous avons



souvent rencontré des menthes sauvages, à odeur forte.

Très souvent des réservoirs artificiels étaient infestés; d'une manière presque constante, nous avons trouvé des *Anopheles* dans les bassins à fleur de terre, communs dans les jardins

potagers (à la condition que l'eau n'y soit pas renouvelée souvent).

Nous n'avons pas trouvé d'*Anopheles* dans les tourbières de l'Hurepois, où l'eau est cependant stagnante, pure, et semble réaliser les conditions favorables au développement des larves.

Le lit de l'OEuf est à sec l'été depuis quelques années; les villages voisins font usage de pompes ou de puits pour les besoins de leurs jardins. Nous n'avons trouvé des *Anopheles* qu'aux sources de la rivière, sources représentées aujourd'hui par des étangs en grande partie desséchés.

CONCLUSIONS

1. Sur les bords de l'Essonne, la disparition du paludisme ne coïncide pas avec celle des *Anopheles*, qui y existent en grand nombre.

2. Nous avons récolté des larves d'*Anopheles* (*A. maculipennis*, *A. bifurcatus*) dans les terres basses, près de la rivière, et très souvent dans des réservoirs artificiels.

3. La disparition du paludisme n'étant pas due à l'extinction des *Anopheles*, ne pourrait-elle pas être due aux différentes causes suivantes, agissant simultanément :

a. Endiguement des rivières. Boisement de leurs bords;

b. Meilleure hygiène des habitants, résultat d'une plus grande aisance. Usage plus répandu du vin;

c. Dans une certaine mesure, l'usage de la quinine. Nous disons dans une certaine mesure, car la quinine est l'objet, paraît-il, d'un préjugé populaire¹, contre lequel certains médecins de la région ont eu à lutter.

4. L'existence d'*Anopheles* sur les bords de l'Essonne ne constitue-t-elle pas un danger pour les habitants de la région?

Très souvent, des rapatriés des colonies, soldats ou colons, pour la plupart impaludés, reviennent dans leur pays natal; ils ont, justement à l'occasion de ce changement de climat, de nouvelles poussées fébriles; leurs hématozoaires pourraient être transmis aux sujets sains par les *Anopheles*.

1. Dr Nouët (Puisseaux)...